

VIVIANE ROBERTA VIEIRA SOBRAL

**“FORMULAÇÕES EM GEL PARA LIBERAÇÃO DE
BENZOCAÍNA: COMPOSIÇÃO, ESTABILIDADE,
CITOTOXICIDADE E PERMEÇÃO NA PELE”**

**CAMPINAS
2012**



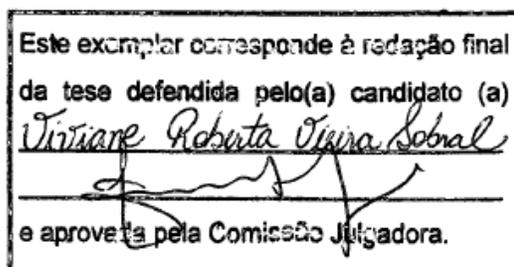
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE BIOLOGIA

**FORMULAÇÕES EM GEL PARA LIBERAÇÃO DE
BENZOCAÍNA: COMPOSIÇÃO, ESTABILIDADE,
CITOTOXICIDADE E PERMEAÇÃO NA PELE**

VIVIANE ROBERTA VIEIRA SOBRAL



Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, Área de Concentração: Bioquímica

Orientadora: Prof^a Dra. Eneida de Paula

Co-Orientadora: Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

Campinas -SP

2012

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

So12f	<p>Sobral, Viviane Roberta Vieira, 1981- Formulações em gel para liberação de benzocaína: composição, estabilidade, citotoxicidade e permeação na pele / Viviane Roberta Vieira Sobral. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientadora: Eneida de Paula. Co-Orientadora: Michelle Franz Montan Braga Leite. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Anestésicos locais. 2. Benzocaína. 3. Géis. 4. Lipossomos. 5. Absorção cutânea. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Franz-Montan, Michelle. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	---

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Gel formulations for the release of benzocaine: composition, stability, cytotoxicity and skin permeation

Palavras-chave em Inglês:

Local anesthetics

Benzocaine

Gels

Liposomes

Skin absorption

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Eneida de Paula [Orientadora]

Daniele Ribeiro de Araújo

Marlus Chorilli

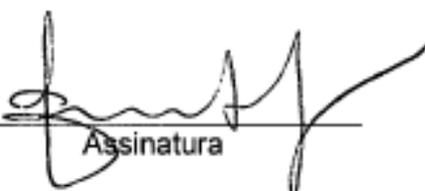
Data da defesa: 08-08-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 8 de agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Eneida de Paula
(Orientadora)



Assinatura

Profª. Drª Daniele Ribeiro de Araújo



Assinatura

Prof. Dr. Marlus Chorilli



Assinatura

Profª. Drª. Cintia Maria Saia Cereda

Assinatura

Profª. Drª. Lucimara Gaziola de La Torre

Assinatura

“Até os adolescentes podem esgotar-se e jovens robustos podem cambalear, mas aqueles que contam com o Senhor, renovam suas forças; ele dá-lhes asas de águia. Correm sem se cansar, vão para frente sem se fatigar.”
Isaias 40. 30-31



“A Deus que me concedeu o Dom da vida e por ter colocado no meu caminho pessoas maravilhosas, como meus pais e meu marido”

AGRADECIMENTOS

Obrigada Meu Deus e Minha Mãe Maria, por cuidarem tão bem de mim.

A Prof^ª Eneida, pela oportunidade que me foi dada. Obrigada por acreditar e confiar em mim, sem você esse sonho não seria possível. Você sempre será lembrada com admiração pela sua competência e pelo seu entusiasmo em lecionar.

A minha querida coorientadora e amiga, Michelle, com mil ideias na cabeça e sempre disponível até nos fins de semana para me ajudar. Muito obrigada por tudo.

À *UNICAMP* pelas oportunidades e experiências;

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* pelo apoio financeiro.

Aos professores Edvaldo Sabadini, Maria Helena Andrade Santana e Nelson E. Duran Caballero e suas equipes, por cederem o espaço do laboratório para desenvolvimento do meu trabalho.

A Lilian de Padula, pela imensa colaboração na realização dos meus testes de reologia.

Aos amigos e companheiros do laboratório Biomembranas: Cleyton, Vivi Guilherme, Vivi Queiroz, Bruna, Raquel, Allan, Sheila, Natalie, Grilo. Obrigada a todos pelos ensinamentos, pela amizade e pelas risadas nestes anos de trabalho. Cada um de sua maneira contribui para que meus dias fossem melhores e também na conclusão deste trabalho.

A um anjo que Deus colocou no laboratório para amparar todos os mestrandos desesperados: Cintia Cereda. Amiga, obrigada pelo sorriso sempre alegre, pela ajuda constante em todos os momentos e pelo exemplo de bom caráter e serenidade. Você é o Maximo!

Maribel e Márcio, o que seria de nós sem vocês? Muito obrigada por tudo, pela ajuda nos trabalhos e pela amizade.

A minha querida amiga Ana Lais, amiga de trabalho, de mestrado, e de muitos outros momentos. Foi muito bom ter você por perto todo esse tempo, sempre me ajudando e me ouvindo. Ninguém melhor do que você soube como foram esses dois anos de trabalho. Obrigada por tudo amiga!

A um casal muito especial de amigos: Camila e Mário, presentes em muitos momentos da minha vida. Obrigada pela amizade e pelo grande apoio. Casinha com toda sua calma, me ajudando nos momentos mais tensos e o Mário sempre ligado no 220 V, mas sempre me fazendo rir..... o dia da Frisca foi demais !!!!!

A empresa onde trabalho, Medley, que me possibilitou essa oportunidade de crescimento. A Dê, Jussara e Jef, por toda compreensão nos momentos em que precisei me ausentar para dar andamento no meu projeto.

Ao meu amigo de trabalho José Arthur, sempre dando uma “mãozinha” quando tive dificuldades com os cálculos. Nunca me deixou esquecer: – Vivi, quando você defende?

A minha amiga Elaine, pelo *help* nos cálculos da validação. Até na minha tese de mestrado você teve participação!!!

Aos grandes amigos que a vida me deu de presente: minhas queridas amigas de CB, meus amigos de Campinas e da Medley, os amigos que fiz em Lagoa que são como uma família, saibam que amo muito vocês e o carinho de cada um me deu força para alcançar essa conquista.

Aos meus amigos do ECC. Nunca me deixam esquecer que Deus é a base de tudo!

Ao meu irmão e meus amados sobrinhos, pelo amor que sempre demonstraram mesmo com a distância que nos separa.

E, por fim, e não menos importante, gostaria de agradecer de coração ao meu esposo e amigo, Dalton, que está sempre ao meu lado em todos os momentos, me dando força e carinho. É muito bom ter você por perto. Te amo muito!

A minha família e também a família do Dalton que também é minha, muito obrigada pela força e pelo carinho.

E aos meus pais, por quem tenho a maior admiração do mundo. Só Deus sabe como eu amo vocês. Obrigada por tudo o que sou!!!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIações	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. PELE	1
1.2. GÉIS DE USO TÓPICO	5
1.3. LIPOSSOMAS	8
1.4. LIPOSSOMAS ELÁSTICOS	12
1.5. ANESTESICOS LOCAIS	17
1.6. BENZOCAINA	22
II. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
III. MATERIAIS & MÉTODOS	26
3.1. FÁRMACO, ADJUVANTES FARMACOTÉCNICOS E SOLVENTES	26
3.2. EQUIPAMENTOS	26
3.3. METODOLOGIA	27
3.3.1. Preparo das Formulações:	27
3.3.1.1. Preparo dos lipossomas convencionais (LC)	27
3.3.1.2. Preparo dos lipossomas elásticos (LE)	28
3.3.1.3. Preparo do gel	29
3.3.1.4. Preparo dos géis lipossomais	30
3.3.1.5. Gel não lipossomal	30
3.3.2. Caracterização dos lipossomas	31
3.3.2.1. Determinação do diâmetro médio das vesículas, por espalhamento dinâmico luz	31
3.3.2.2. Medidas do potencial Zeta	32
3.3.2.3. Determinação da porcentagem de encapsulação e coeficiente de partição da Benzocaína	33
3.3.2.4. Morfologia: Microscopia Eletrônica de Transmissão	34
3.3.3. Caracterização das formulações em gel	34
3.3.3.1. Determinação de metodologia analítica para quantificação da BZC nos géis lipossomal e não lipossomal	34
3.3.3.2. Degradação de benzocaína e avaliação do método indicativo de estabilidade	37
3.3.3.3. Ordem das reações de degradação da benzocaína	38
3.3.4. Estudos de Estabilidade	39

3.3.4.1. Análise do pH _____	40
3.3.4.2. Determinação do teor de BZC nas formulações _____	40
3.3.4.3. Perda de peso _____	40
3.3.5. Peroxidação lipídica – estimativa da oxidação fosfolipídica (estabilidade química) _____	41
3.3.6. Análise reológica _____	42
3.3.7. Avaliação in vitro da toxicidade das formulações de benzocaína em cultura de células _____	45
3.3.8. Ensaio de liberação e permeação de benzocaína das formulações em gel em células de difusão vertical do tipo Franz _____	47
IV. ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	49
V. RESULTADOS & DISCUSSÃO _____	50
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS: _____	50
5.1.1. Distribuição do diâmetro médio das vesículas lipossomais _____	50
5.1.2 Potencial Zeta _____	51
5.1.3. Determinação da porcentagem de encapsulação e coeficiente de partição _____	52
5.1.4. Morfologia: Microscopia Eletrônica de Transmissão _____	53
5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES EM GEL _____	55
5.2.1. Validação de metodologia analítica para quantificação da BZC encapsulada ou não em lipossomas e incorporada nos géis _____	55
5.2.2. Degradação de benzocaína _____	60
5.2.3. Ordem das reações de degradação da benzocaína _____	65
5.2.4. Estimativa da oxidação fosfolipídica (peroxidação lipídica) dos lipossomas presentes nos géis em estabilidade _____	67
5.2.5. Estudo de estabilidade - Determinação de teor, pH e perda de peso dos géis de benzocaína lipossomais e não lipossomais. _____	68
5.2.6. Análise reológica _____	73
5.2.7. Avaliação in vitro da toxicidade das formulações de benzocaína em cultura de células (viabilidade celular) _____	80
5.2.8. Ensaio de liberação de benzocaína das formulações em gel _____	83
5.2.9. Ensaio de permeação in vitro através da pele _____	86
VI. CONCLUSÕES _____	90
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das camadas da pele humana: epiderme, derme. ____	2
Figura 2. Representação esquemática das vias de penetração de solutos _____	4
Figura 3. Estrutura química do ácido acrílico, monômero formador do polímero Carbopol ____	6
Figura 4. Representação esquemática do processo de auto-organização das moléculas de fosfolipídios individuais (a) em bicamadas planas (b) e concêntricas (c), formando os Lipossomas. A bicamada lipídica possui tipicamente 5 nm de espessura e consiste de uma dupla camada de lipídios individuais dispostos ordenadamente, lado a lado, com suas caudas hidrofóbicas voltadas para o interior da bicamada (d) e as cabeças polares voltadas para a superfície externa, em contato com o meio aquoso (adaptado de Jesorka & Orwar, 2008) ____	9
Figura 5. Esquema de um lipossoma elástico formado por moléculas de fosfatidilcolina de ovo e polioxietileno lauril éster (PEG 8-L). _____	13
Figura 6. Deformação de lipossomas elásticos durante a penetração entre os poros intercelulares da pele. _____	14
Figura 7. Estrutura química dos anestésicos locais do tipo amino-éster - procaína e tetracaína _____	18
Figura 8. Estrutura química dos anestésicos locais do tipo amino-amida - prilocaína, lidocaína, ropivacaína e bupivacaína _____	19
Figura 9. Estrutura química da benzocaína. _____	23
Figura 10. Representação esquemática do preparo do gel base _____	29
Figura 11. Representação esquemática do procedimento farmacotécnico de preparo das formulações de gel de benzocaína lipossomal. _____	30
Figura 12. Representação esquemática do procedimento farmacotécnico de preparo das formulações de gel de benzocaína não lipossomal. _____	31
Figura 13. Representação de uma curva de perfil reológico, mostrando o distanciamento (seta azul) entre a curva ascendente e descendente denominado de histerese. _____	44
Figura 14. Estrutura química do MTT. _____	46
Figura 15. Representação esquemática da célula de difusão vertical (célula de Franz). Adaptado http://www.permegear.com/franz.htm . Acessado em 21 de janeiro de 2010 _____	47
Figura 16. Potencial zeta dos lipossomas avaliados no presente trabalho: lipossomas convencionais de 100 nm, e lipossomas elásticos EPC:PEG-8L 3:2 (v:v), todos dispersos em água em temperatura ambiente. _____	51

Figura 17. Imagens obtidas em microscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas: (a1) lipossomas convencionais (60.000 x), (a2) lipossoma convencional (100.000 x), (b1) lipossomas convencionais contendo BZC (60.000 x), (b2) lipossoma convencional contendo BZC (100.000 x), (c1) lipossomas elásticos vazios (60.000 x), (c2) lipossoma elástico vazio (100.000 x), (c1) lipossomas elástico contendo BZC (60.000 x), (b2) lipossoma elástico contendo BZC(100.000 x), _____	54
Figura 18. Cromatograma das amostras de placebo, padrão e gel de benzocaína, analisadas segundo as condições cromatográficas descritas. _____	55
Figura 19. a) Cromatograma tridimensional (absorbância vs. tempo de retenção vs. Comprimento de onda) de uma solução de benzocaína pura. b) Gráfico de determinação de pureza de pico de benzocaína _____	56
Figura 20. Curva de calibração de Benzocaína (Linearidade) _____	57
Figura 21. Degradação da benzocaína sob diferentes condições de estresse. _____	60
Figura 22. Cromatograma de amostra de gel de benzocaína – (a) amostra inicial sem exposição ao NaOH 0,1N, (b) benzocaína após 10 minutos de exposição ao hidróxido de sódio, (c) após 24 horas de exposição ao hidróxido de sódio. _____	62
Figura 23. Cromatograma da amostra de gel de benzocaína em 3D, após 10 minutos de exposição ao NaOH 0,1N. _____	63
Figura 24. Fórmula estrutural do ácido p-aminobenzóico _____	63
Figura 25. Sobreposição dos cromatogramas de um padrão de ácido p-aminobenzóico (linha verde) e de uma amostra de benzocaína (linha azul), após 120 minutos de exposição ao meio alcalino (NaOH 0,1N). _____	64
Figura 26. Cromatogramas de amostras de benzocaína após 3 minutos (linha verde), 10 minutos (linha azul claro) e 30 minutos (linha rosa) de exposição ao NaOH 0,1N. _____	65
Figura 27. Ajuste dos dados de degradação da BZC em NaOH 0,1N para cinética de a) ordem zero; b) primeira ordem; c) segunda ordem _____	66
Figura 28. Teste de peroxidação lipídica pela medida de MDA (10^{-6} M) em formulações em gel de benzocaína lipossomal (lipossomas convencionais e elásticos): análise inicial, após 3 e 6 meses de armazenamento a 40°C e 75% de UR). Análise estatística: ANOVA/Tukey-Kramer, $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***). _____	67
Figura 29. Média das medidas de pH das formulações em gel de benzocaína, durante 6 meses de estabilidade acelerada (40°C a 75% U.R.). _____	69
Figura 30. Frasco de vidro com tampa de plástico, empregado inicialmente para armazenar as amostras preparadas para estudo de estabilidade. _____	70

Figura 31. Bisnaga de alumínio, adotada posteriormente para armazenamento das formulações em gel.	70
Figura 32. Avaliação de perda de peso das formulações de benzocaína 10% não lipossomal, após 3 e 6 meses de estabilidade	71
Figura 33. Avaliação de perda de peso das formulações de benzocaína 10% em lipossomas elásticos, após 3 e 6 meses de estabilidade.	72
Figura 34. Perfil reológico dos diferentes géis de benzocaína, recém preparados, analisados nas temperaturas de 25°C e 32°C a) BZC 10%; b) BZC 10% LC; c) BZC 10% LE; d) BZC 20%; e) Benzotop®	75
Figura 35. Viscosidade do geis de Benzocaína em diferentes temperaturas (25°C e 32°C).	77
Figura 36. Variação na tensão de cisalhamento (esquerda) e viscosidade (direita) dos géis de Benzocaína em diferentes tempos após preparo (tempo inicial, 3 e 6 meses, medidos a 25°C.	80
Figura 37. Testes de citotoxicidade: análise da viabilidade celular (teste do MTT) de fibroblastos 3T3 (Balb/C) após tratamento (2hs) com as formulações de benzocaína: BZC 10%, BZC 10% LC, BZC 10% LE, Benzotop e respectivos géis controle: gel controle, gel LC controle e gel LE controle. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT ± DP. n=5 experimentos. Análise estatística ANOVA/Tukey-Kramer, p<0,05(*); p<0,01(**); p,0,001(***)	81
Figura 38. Perfis de liberação de benzocaína (µg/cm ²) através de membrana artificial com poro de 30 nm a partir das formulações em gel aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína	83
Figura 39. Perfis de liberação de benzocaína (%/cm ²) através de membrana artificial com poro de 30 nm a partir das formulações em gel aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína.	84
Figura 40. Perfis de liberação de benzocaína (%/cm ²) através de pele de orelha de porco a partir das formulações em gel aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína. Dados apresentados como média e desvio padrão (n= 6-8)	87
Figura 41. Perfis de liberação de benzocaína (%/cm ²) através de pele de orelha de porco a partir das formulações em gel aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína. Dados apresentados como média e desvio padrão (n= 6-8)	87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Formulações de lipossomas não convencionais discutidos na literatura _____	17
Tabela 2. Características físico-químicas e farmacológicas dos anestésicos locais. _____	22
Tabela 3. Componentes utilizados no preparo do gel base. _____	29
Tabela 4. Equações matemáticas aplicadas para o estudo cinético e comparativo dos perfis de liberação das formulações _____	49
Tabela 5. Diâmetro médio medido por intensidade (D_m) e polidispersão dos lipossomas ($1,0 \cdot 10^{-3}$ M) contendo ou não BZC, utilizados para o preparo das formulações lipossomais de BZC. ____	50
Tabela 6. Valores de porcentagem de encapsulação e do coeficiente de partição (P) da benzocaína em vesículas lipossomais convencionais e elásticas. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, para um n de 3 experimentos em dias distintos. _____	52
Tabela 7. Resultados da precisão por repetibilidade para o método de quantificação da BZC.	58
Tabela 8. Resultados da precisão intermediária do método para quantificação da BZC – Dia 1- Equipamento 1 _____	58
Tabela 9. Resultados da precisão intermediária do método para quantificação da BZC – Dia 2- Equipamento 2 _____	58
Tabela 10. Resultados de exatidão do método quantitativo de análise da BZC. _____	59
Tabela 11. Resultados do teste de estabilidade de soluções contendo BZC. _____	59
Tabela 12. Valores determinados para o limite de detecção e limite _____	60
Tabela 13. Resultados de teor de benzocaína nos géis em estudo de estabilidade acelerada (análise inicial, 3 meses e 6 meses) após armazenamento a 40°C e 75% de umidade. _____	70
Tabela 14. Resultados de teor de benzocaína nos géis submetidos aos ensaios de estabilidade acelerada (análise inicial, 3 meses e 6 meses após preparo). _____	72
Tabela 15. Cálculo comparativo da área da histerese dos géis, a 25°C (em $\text{Pas} \cdot \text{s}^{-1}$) recém preparados _____	76
Tabela 16. Cálculo de IC_{50} para as linhagens 3T3, após tratamento com as formulações em gel: BZC 10%, BZC 10% LC, BZC 10% LE e BZC 20%. Análise estatística ANOVA/Tukey-Kramer, $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**) _____	82
Tabela 17. Coeficientes de correlação obtidos com os modelos de zero ordem e Higuchi para liberação das formulações em gel de BZC aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína _____	84
Tabela 18. Parâmetros de permeação de benzocaína a partir de diferentes composições de géis, através de membrana artificial (30nm). _____	85

Tabela 19. Coeficientes de correlação obtidos com os modelos de zero ordem e Higuchi para permeação das formulações em gel de BZC aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína _____ 88

Tabela 20. Parâmetros de permeação de benzocaína a partir de diferentes composições de géis, através de pele de orelha de porco. _____ 89

LISTA DE ABREVIações

BHT: butilidroxitolueno

BZC: benzocaína

BZC 10%: gel de benzocaína a 10% (não lipossomal)

BZC 10% LC: gel de benzocaína a 10% encapsulada em lipossomas convencionais

BZC 10% LE: gel de benzocaína a 10% encapsulada em lipossomas elásticos

BZC 20%: gel de benzocaína a 20% (não lipossomal)

DP: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

EPC: fosfatidilcolina de ovo

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

LC: Lipossoma convencional

LE: Lipossoma elástico

LUV: vesículas unilamelares

PDI – índice de polidispersividade

PEG-8-L: octaoxietileno lauril éster

RPE: Ressonância Paramagnética eletrônica

SC: estrato córneo (do latim stratum corneum)

SDS: dodecilsulfato de sódio

TBA: ácido tiobarbitúrico

TEA: trietanolamina

TEP: tetraetoxipropano

Time-lag: tempo necessário para permeação inicial do fármaco

UR: umidade relativa

RESUMO

Benzocaína (BZC) é um anestésico local do tipo éster usado principalmente em formulações de uso tópico, dérmico ou em mucosas. Em estudos anteriores de nosso laboratório, a interação da BZC com lipossomas convencionais compostos de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e alfa-tocoferol foi caracterizada. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que lipossomas elásticos, preparados com adição de um tensoativo, apresentam vantagens em relação aos convencionais, pois conseguem atravessar de maneira mais eficiente o estrato córneo. O objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar, sob o aspecto físico-químico e farmacêutico, diferentes formulações em gel de benzocaína: BZC a 10% e 20%, BZC a 10% encapsulada em lipossomas convencionais (LC) ou lipossomas elásticos (LE) e formulação comercial (contendo BZC a 20%). A quantificação do teor de benzocaína nas formulações foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência e validada segundo o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (Brasil, 2003). Em estudos de estabilidade acelerada (Brasil, 2005) foram avaliados: peroxidação lipídica, pH, teor e comportamento reológico das formulações. As formulações recém-preparadas foram avaliadas também quanto à citotoxicidade, liberação e permeação *in vitro*. Todas as formulações mostraram-se estáveis por até 6 meses, com pequenas variações de pH e teor; a peroxidação lipídica aumentou ao final deste período, porém a quantidade de peróxidos formados não ultrapassou 1% do total de lipídios presentes na formulação. As formulações lipossomais apresentaram maior estabilidade reológica que o produto comercial e também maior fluxo nos ensaios de liberação ($293,96 \pm 22,90 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ para LC e $276,88 \pm 25,40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ para LE) e permeação *in vitro* ($48,10 \pm 16,51 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ para LC e $52,77 \pm 11,95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ para LE). Testes de toxicidade em culturas de células de fibroblastos 3T3 evidenciaram que a formulação preparada com lipossomas convencionais foi a que apresentou menor citotoxicidade com maior IC_{50} ($6,98 \pm 0,52$), em comparação com as demais. Em suma, os novos géis de BZC apresentaram uma série de vantagens sobre o produto disponível no mercado, porém não foi observada maior permeação através da pele da formulação contendo lipossomas elásticos em relação à formulação contendo lipossomas convencionais.

ABSTRACT

Benzocaine (BZC) is an ester type local anesthetic mainly used in topical formulations for either dermal or mucosa. In previous studies from our laboratory, the interaction of BZC with conventional liposomes composed of egg phosphatidylcholine, cholesterol and alpha-tocopherol was characterized. However, recent studies have demonstrated that elastic liposomes prepared with the addition of a surfactant, show advantages over conventional vesicles, as they can effectively cross the stratum corneum. The objective of this study was to evaluate and characterize the physicochemical and pharmaceutical aspects of different gel formulations of BZC: 10% and 20% of BZC, 10% BZC encapsulated into conventional (CL) or elastic liposomes (EL) and commercial formulation (containing 20% BZC). The quantification of BZC in the formulations was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) and validated according to the Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods (Brazil, 2003). Accelerated stability studies (Brazil, 2005) were used to evaluate lipid peroxidation, pH, and rheological behavior of the formulations. The freshly prepared formulations were submitted to cytotoxicity and *in vitro* release tests. All formulations were stable up to 6 months, with minor variations in pH and content of BZC; although the lipid peroxidation increased at the end of that period, the amount of peroxides produced was less than 1% of the total lipids in the formulation. Liposomal formulations exhibited greater rheological stability than the commercial product and also higher flux in release assays ($293.96 \pm 22.90 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ to CL and $276.88 \pm 25.40 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ to EL) and *in vitro* permeation ($48.10 \pm 16.51 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ to CL and $52.77 \pm 11.95 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ to EL). Cytotoxicity in cell cultures of 3T3 fibroblasts showed that the formulation prepared with conventional liposomes was the lowest cytotoxic with higher IC₅₀ (6.98 ± 0.52), compared to the others. In short, the new BZC gels presented several advantages over the commercially available product; however the elastic liposomal gel formulation was not able to promote an increased permeation through the skin when compared with the conventional liposomal gel formulation.

I. INTRODUÇÃO

1.1. PELE

O desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas enfatiza a via de administração transdérmica como alternativa às vias parenteral e oral para transporte de fármacos e neste sentido, a pele oferece muitas vantagens. Os principais motivos residem no fato dessa via não ser invasiva e permitir o fácil acesso de fármacos (tanto local, quanto sistêmico) ao organismo. Além disso, evita a biotransformação de primeira passagem e flutuações dos níveis plasmáticos do fármaco, promove o direcionamento do ingrediente ativo no local de ação e possibilita a utilização de formas farmacêuticas auto-administráveis, o que permite a maior adesão ao tratamento pelos pacientes, principalmente quando são necessárias aplicações repetidas (American Academy of Pediatrics, 1997; Bouwstra et al., 2003; Song et al., 2004; Tanner & Marks, 2008). Por outro lado, a função de barreira natural exibida pela pele intacta é uma das mais importantes limitações à aplicação transdérmica de fármacos (Bouwstra et al., 2003).

A pele (do latim *cútis*) é o maior órgão do corpo humano, constituindo 15% do peso corporal, cobrindo quase todo o corpo à exceção dos orifícios genitais e alimentares, olhos e superfície das mucosas genitais. Este órgão é constituído por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme (com cerca de 50 μm de espessura) e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (com espessura de aproximadamente de 250 μm) (Figura 1). A espessura da epiderme pode apresentar variações de acordo com a localização anatômica, sendo mais espessa em regiões como a palma das mãos, planta dos pés e em algumas articulações. Abaixo e em continuidade com a derme, encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que não faz parte da pele, apenas lhe serve para união com os órgãos subjacentes (Cevc, 2004; Junqueira & Carneiro, 2008).

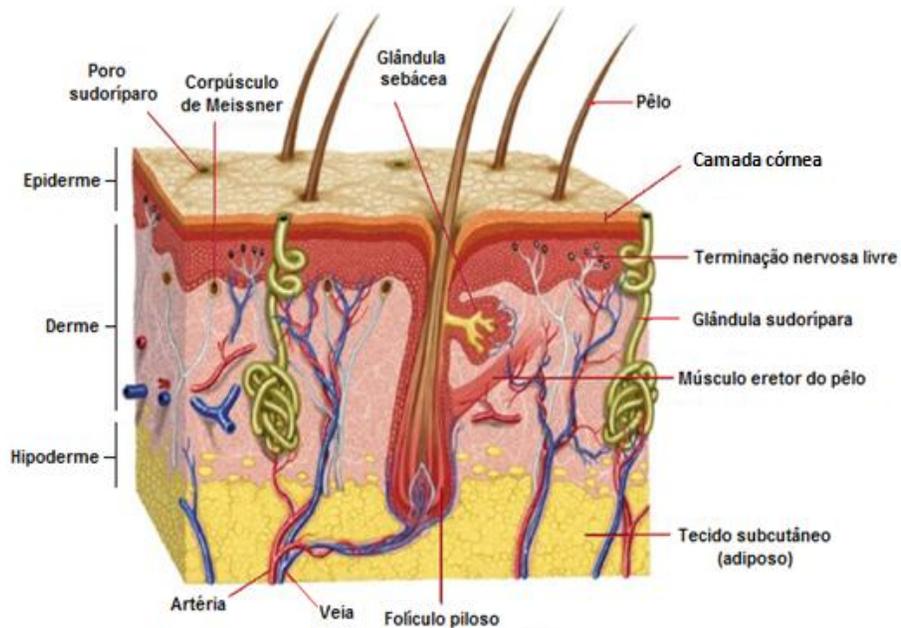


Figura 1. Representação esquemática das camadas da pele humana: epiderme, derme.

Adaptado de: <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>; acessado em 08 de outubro de 2011.

Vista desde a derme para a superfície, a epiderme apresenta cinco camadas (Junqueira & Carneiro, 2008):

- **Camada basal:** suas células repousam sobre a membrana basal, que separa a epiderme da derme. Esta camada é rica em células tronco, por isso também é chamada de camada germinativa, apresentando intensa atividade mitótica, sendo responsável, em conjunto com a camada imediatamente superior a ela (camada espinhosa), pela constante renovação da epiderme;
- **Camada espinhosa:** formada por células de núcleo central e citoplasma com curtas expansões, que contêm filamentos intermediários de queratina (tonofilamentos). As expansões citoplasmáticas se aproximam e se unem às células vizinhas por meio de desmossomos, o que dá à célula um aspecto espinhoso. Os filamentos de queratina e os desmossomos têm importante papel na manutenção da coesão entre as células da epiderme e na resistência ao atrito. Na camada espinhosa também existem células-tronco dos queratinócitos;
- **Camada granulosa:** as células da camada granulosa possuem grânulos lamelares, que se fundem com a membrana plasmática e expulsam o material lipídico para o espaço intercelular desta camada, formando um depósito de lipídios, contribuindo

para a formação de uma barreira contra a penetração de substâncias e para tornar a pele impermeável à água, impedindo a desidratação do organismo;

- Camada lúcida: nesta camada, mais evidente na pele espessa, ainda é possível observar a presença de desmossomos entre as células;
- Camada córnea: também chamada de estrato córneo, tem espessura muito variável e é constituída por células denominadas de corneócitos. Os corneócitos são células escamosas, anucleadas, achatadas, empacotadas por filamentos de queratina, circundados por lipídios apolares e interconectados por estruturas protéicas chamadas desmossomos. Os corneócitos estão acondicionados em pilhas paralelas à superfície da pele. Uma notável exceção acontece em poucas camadas celulares parcialmente destacadas e próximas à superfície da pele (onde o arranjo dos corneócitos é menos compactado) e em células próximas ao estrato granuloso, onde o processo de diferenciação celular está no início. O estrato córneo possui em média 15 camadas de corneócitos e uma espessura média nos mamíferos de cerca de 300 nm (entre 220 e 400 nm), mas valores de até 800 nm foram relatados (Bouwstra et al., 2003; Cevc, 2004; Junqueira & Carneiro, 2008). Esta camada de células não-viáveis atuam 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).

A epiderme é uma camada dinâmica e renovada constantemente, tal que as células perdidas para a superfície do estrato córneo são balanceadas pelo crescimento de novas células, chamadas de queratinócitos. Os queratinócitos são originados na camada basal e sofrem maturação durante a sua migração através do estrato espinhoso e estrato granuloso, ocorrendo mudanças tanto na sua estrutura quanto na sua composição. Os queratinócitos sintetizam e expressam diferentes proteínas estruturais e lipídios durante a sua maturação. Na última sequência de diferenciação, essas células sofrem profundas mudanças na sua estrutura, resultando na formação dos corneócitos (Bouwstra et al., 2003).

Os corneócitos são imersos em uma matriz lipídica organizada em arranjo lamelar cristalino e são limitados por uma estrutura protéica densa e reticulada. Tal organização confere ao estrato córneo uma natureza hidrofóbica, o que limita a taxa de difusão de moléculas através do mesmo (Bouwstra & Honeywell-Nguyen, 2002). A quantidade de água presente no estrato córneo corresponde de 15% a 20% do peso seco deste tecido, embora

existam variações que dependem da umidade do ambiente. Em geral, o aumento da hidratação do estrato córneo provoca o aumento da permeação através desse tecido. Por essa razão, a hidratação desempenha um importante papel no aumento da permeação de solutos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (Williams e Barry, 2004).

A permeação transdérmica de fármacos possui três possíveis rotas:

- Via transeaxal: através dos apêndices da pele que são os folículos capilares, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, considerados recentemente uma importante via para a penetração de drogas (Jacobi et al., 2007)
- Via intercelular: através dos domínios lipídicos intercelulares presentes no estrato córneo (Figura 2) (Potts & Guy, 1992).
- Via transcelular: através das células do estrato córneo, mais precisamente através dos feixes de queratina localizados dentro dos corneócitos (Figura 2) (Potts & Guy, 1992).

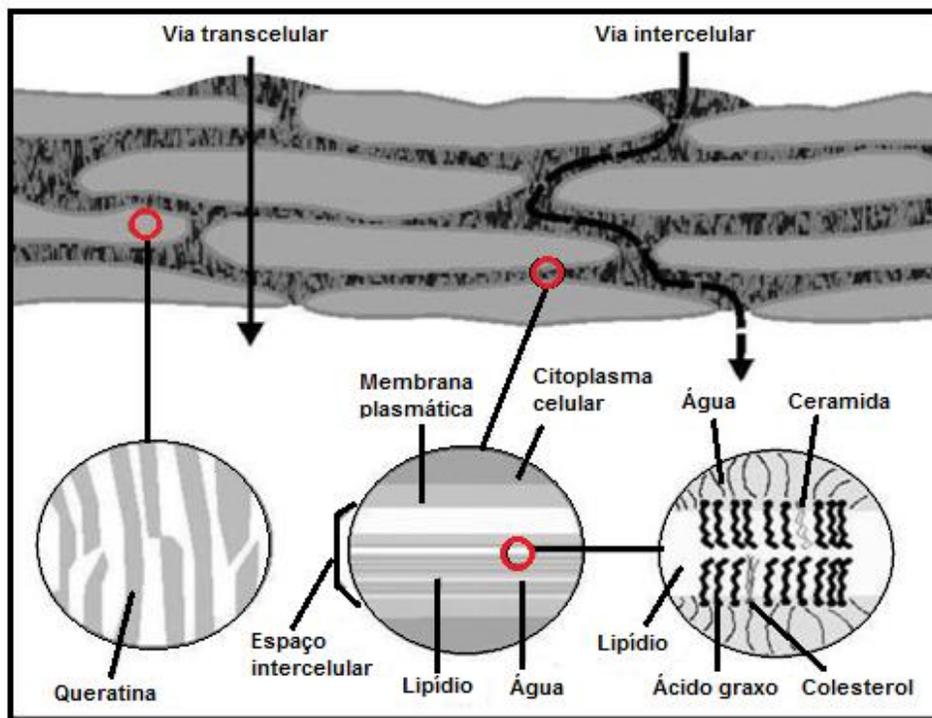


Figura 2. Representação esquemática das vias de penetração de solutos através da pele (adaptado de Gratieri et al., 2008).

A concepção de impermeabilidade relativa da pele limitou, durante muito tempo, a estratégia de administração cutânea de medicamentos aos tratamentos puramente dermatológicos. Este conceito era consequência de uma visão unicamente fisiológica da pele,

onde predominava a função de barreira deste órgão. Graças aos trabalhos pioneiros de autores como Scheuplein em 1966, hoje é notório que essa barreira, constituída principalmente pelo estrato córneo, não é absoluta e que a penetração cutânea de um fármaco, condicionada em grande parte por suas características físico-químicas, pode viabilizar a sua absorção capilar e, conseqüentemente, sua ação sistêmica (Cornelio & Mayorga 2007).

1.2. GÉIS DE USO TÓPICO

Os géis são sistemas semi-sólidos que consistem em dispersões de pequenas ou grandes moléculas em um veículo líquido aquoso que adquire consistência semelhante às geléias pela adição de um agente gelificante. Entre os agentes gelificantes usados estão as macromoléculas sintéticas, como o carbômero; os derivados da celulose como carboximetilcelulose e hidropropilcelulose e as gomas naturais, como a goma adraganto. (Allen Jr et al, 2007).

Vários polímeros vêm sendo testados nas formulações de géis de aplicação cosmética e/ou farmacêutica. Os géis hidrofílicos apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomais. Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que, quando dispersos em meio aquoso, assumem uma conformação que confere a viscosidade à preparação. Logo, pode-se definir o gel como uma preparação semi-sólida, composta de partículas coloidais que não se sedimentam, mas ficam dispersas (Corrêa et al., 2005).

O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico deste alterando a estabilidade física do produto, assim como seu comportamento sobre a pele (liberação do ativo pelo veículo e formação de filme sobre a pele) resultando em diferentes graus de aceitação do mesmo pelo consumidor (Corrêa et al., 2005).

Os carbômeros são polímeros hidrossolúveis de elevado peso molecular de ácido acrílico reticulado com ésteres alílicos de sacarose e/ou pentaeritritol . (Allen Jr et al, 2007). É um agente espessante de baixo custo e sensível ao pH (Al-Malah, 2006). Estes polímeros, que também são conhecidos comercialmente com o nome de Carbopol[®], formam um hidrogel em água ou solução alcalina, devido a hidratação dos grupos carboxila em sua estrutura (Figura 3). Em razão desta propriedade, o Carbopol[®] tem sido usado como uma matriz de gel em suspensões e cremes para uso externo ou como uma matriz para bioadesivos bucal, formulações retal e nasal (Muramatsu et al., 2000).

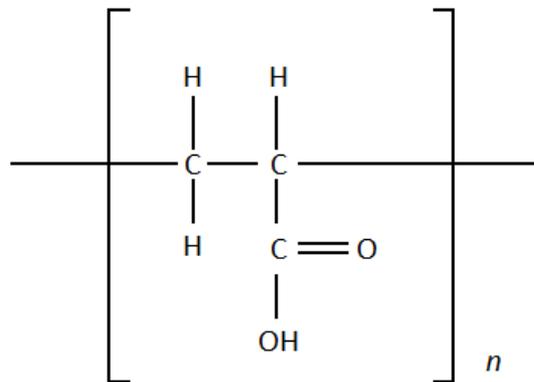


Figura 3. Estrutura química do ácido acrílico, monômero formador do polímero Carbopol

Algumas formulações de anestésicos locais (AL) estão disponíveis para uso tópico. A lidocaína, a prilocaína, a dibucaína, a tetracaína e a benzocaína são os agentes mais empregados (de Paula et al., 2010). Em geral essas preparações produzem anestesia efetiva, mas relativamente curtas quando aplicadas em mucosas ou à pele despitelizadas, além de possuírem elevado tempo de latência (Strichartz, 1987).

As injeções de soluções de anestésicos locais são dolorosas, causam ansiedade no paciente e podem causar edema local, que distorce o sítio cirúrgico. As formulações tópicas de anestésicos evitam essa situação e se tornaram parte da rotina e prática diária na medicina. Anestésicos tópicos podem ser usados previamente à biópsias, microcirurgias, aplicações de laser e toxina botulínica, diminuindo a dor e ansiedade dos pacientes. Mesmo as crianças podem sofrer pequenos procedimentos sem anestesia geral, porque a percepção da dor pode ser superada com a aplicação de um anestésico tópico (Kaweski, 2008).

Poucas formulações anestésicas para uso dérmico apresentam eficácia. A mistura eutética dos AL lidocaína e prilocaína (ambos a 2,5%), comercialmente chamada de EMLA[®], é uma das formulações tópicas mais utilizadas para uso dermatológico, com eficácia e segurança comprovadas (Friedman et al., 2001; Sawyer et al., 2009). Esta formulação promove analgesia satisfatória para inúmeros procedimentos dermatológicos como punção venosa e inserção de cateter (Cordoni & Cordoni, 2001; Fetzer, 2002), biópsia por aspiração em nódulos da tireóide (Gursoy et al., 2007), punção na medula (Koscielniak-Nielsen et al., 1998), destruição de lesão superficial de pele por eletrocirurgia (Carter et al., 2006), biópsia ou curetagem excisional e eletrocirurgia (Gupta & Sibbald, 1996) e como anestesia tópica prévia a realização de anestesia raquidiana (Sharma et al., 1996).

No entanto o EMLA[®] necessita ser aplicado com curativo oclusivo por 1 a 2 horas para ter eficácia anestésica (Tadicherla & Berman, 2006). Em casos de procedimentos mais dolorosos como enxertos de pele, é recomendado no mínimo 2 horas de aplicação prévia ao procedimento (Lähteenmäki et al., 1988). Segundo o fabricante, o efeito máximo é atingido de 2 a 3 horas após a aplicação e pode se prolongar por até 2 horas após a sua remoção (AstraZeneca, 2004).

A demora no tempo de latência é uma desvantagem significativa para esta formulação, 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 (Castillo, 1999).

Cabe notar que todas as estratégias para aumentar a penetração dos anestésicos tópicos como o contato prolongado com a superfície da pele, a oclusão ou o uso de adesivos, podem resultar em maior absorção do fármaco para a circulação sistêmica, aumentando o risco de toxicidade do AL (Sheil et al., 2006).

Apesar de o EMLA[®] ser considerado uma formulação anestésica segura para uso tópico dermatológico, diversos casos de toxicidade foram relatados na literatura, inclusive toxicidade para o sistema nervoso central, metahemoglobinemia e coma. No entanto, todos os casos relatados estavam associados com o uso de altas quantidades de EMLA[®] aplicados com curativo oclusivo (Touma & Jackson, 2001; Parker et al., 2004; Eekhof et al., 2006; Raso et al., 2006).

A benzocaína vem sendo utilizada em forma de gel a 20% com a finalidade de aliviar a dor em procedimentos odontológicos durante a inserção da agulha em anestésias infiltrativas e bloqueios. Nusstein & Beck (2003), avaliaram a eficácia do gel de benzocaína a 20% antes de diversas técnicas de anestesia local e concluíram que ele foi efetivo em diminuir a dor provocada pela inserção da agulha em injeção infiltrativa na região anterior de maxila, quando comparada a pacientes que não receberam a aplicação do anestésico local. No entanto, o anestésico tópico não foi eficaz em reduzir a dor da punção da agulha em técnica do bloqueio do nervo alveolar inferior e anestesia infiltrativa na região posterior de maxila (Nusstein & Beck, 2003).

Géis de benzocaína a 15% preparados com hidroximetilpropilcelulose com propriedades bioadesivas também estão descritos na literatura. Sua taxa de permeação através da pele foi estudada utilizando vários promotores de absorção como glicóis, tensoativos não iônicos e ácidos graxos. Entre todos os promotores testados, o gel contendo dietilenoglicol foi o que apresentou maior permeação *in vitro* e de acordo com avaliação do

efeito analgésico em ratos este mesmo promotor de absorção aumentou em 1,4 vezes a atividade anestésica quando comparado com os géis sem dietilenoglicol (Shin et al., 2003).

1.3. LIPOSSOMAS

Há várias décadas existe um grande interesse em explorar novas técnicas para aumentar a absorção de fármacos através da pele. Esta abordagem inclui o uso de promotores de absorção químicos, físicos ou tratamentos elétricos que visam romper a estrutura de barreira da pele. Todos eles são baseados em duas estratégias: aumento da permeabilidade deste órgão ou direcionamento do fármaco no local de ação. Entre os sistemas carreadores, os lipossomas tem apresentado vantagens e sucesso como forma de administrar fármacos através da rota transdérmica (Santana & Zanchetta, 2011).

A otimização dos sistemas de liberação sustentada (*“drug delivery”*) busca conseguir um equilíbrio entre os requisitos físico-químicos para estabilidade dos constituintes ativos e inertes da formulação e a preservação contra a contaminação microbiológica, e mais importante, a liberação do fármaco para a pele em um sistema que permite a liberação adequada dos princípios ativos (Purdon et al., 2004).

Desde a observação pioneira de Alec Bangham há quase 50 anos atrás, de que os fosfolipídios em solução aquosa podem formar estruturas em bicamadas concêntricas, os lipossomas percorreram um longo caminho até os dias de hoje, quando podem ser considerados carreadores de escolha para inúmeras aplicações farmacêuticas (Torchilin, 2005).

Os lipossomas são estruturas fechadas, esféricas, formadas por uma ou várias bicamadas lipídicas, separadas por compartimentos aquosos. Em relação ao tamanho e número de lamelas, existem diferentes tipos de vesículas lipossomais, dentre as quais podemos citar (Torchilin, 2005):

- Vesículas multilamelares grandes, com tamanho que varia de 500 a 5000 nm e contêm várias bicamadas concêntricas;
- Vesículas unilamelares pequenas, com cerca de 100 nm de tamanho e formadas por uma única bicamada lipídica e;
- Vesículas unilamelares grandes, com tamanho entre 200 e 800 nm;

Os lipossomas chamados de primeira geração são aqueles compostos por lipídios de ocorrência natural, como fosfolipídios e colesterol. No entanto, modificações na composição lipídica permitem classificar os lipossomas como:

- Lipossomas de longa circulação: que são vesículas modificadas (contém algum polímero em sua superfície além dos lipídios) e podem permanecer no sangue por muito mais tempo que os lipossomas convencionais, pois não são reconhecidos pelo sistema reticuloendotelial e, portanto, demandam maior tempo para serem removidos da circulação sanguínea (Moghimi & Szebeni, 2003).

- Imunolipossomas: são lipossomas que carregam anticorpos ligados à sua superfície e são capazes de se acumular em uma área que o anticorpo reconhece, ligando-se ao seu antígeno (Torchilin, 2005):

De fato, os lipossomas são análogos das membranas naturais, considerados modelos biomiméticos e são formados pela auto-organização espontânea de lipídios puros ou de mistura de lipídios, quando agitados na presença de água.

Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas que, em solução aquosa, formam estruturas lamelares com energia favorável, resultado das interações hidrofílicas e hidrofóbicas (Figura 4) (Jesorka & Orwar, 2008).

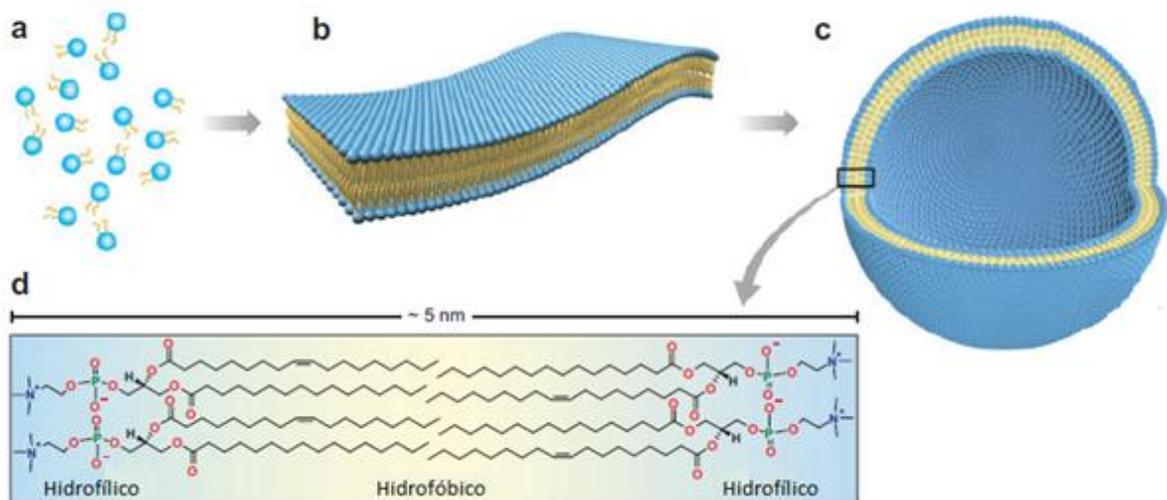


Figura 4. Representação esquemática do processo de auto-organização das moléculas de fosfolipídios individuais (a) em bicamadas planas (b) e concêntricas (c), formando os Lipossomas. A bicamada lipídica possui tipicamente 5 nm de espessura e consiste de uma dupla camada de lipídios individuais dispostos ordenadamente, lado a lado, com suas caudas hidrofóbicas voltadas para o interior da bicamada (d) e as cabeças polares voltadas para a superfície externa, em contato com o meio aquoso (adaptado de Jesorka & Orwar, 2008)

Os fosfolipídios mais comumente utilizados para formar lipossomas são a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, de carga total neutra (zwitterionica), além de lipídios

com carga negativa como o ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol e fosfatidilserina. Fosfolipídios naturais possuem uma combinação diferente de cadeias de ácidos graxos (saturados ou mono e di-insaturados, com diferente número de carbonos) na região hidrofóbica da molécula. Os compostos sintéticos DOTAP (1,2-dioleoiloxi-3-trimetilamônio propano) e a estearilamina podem ser empregados quando lipossomas catiônicos são necessários, já que lipídios com carga positiva não são encontrados nas membranas biológicas. Além da carga, a natureza dos resíduos de ácidos graxos em cada molécula de lipídio, particularmente o número de ligações duplas na cadeia, é responsável pelas propriedades fundamentais da bicamada tais como o comportamento de fases e elasticidade (Jesorka & Orwar, 2008; Santana & Zanchetta, 2011).

A presença de insaturação e o tamanho da cadeia hidrofóbica dos fosfolipídios que compõem a membrana determinam a fluidez dos lipossomas. Ácidos graxos insaturados como ácido oléico e ácido linoléico tem temperatura de transição de fase mais baixa que os ácidos graxos saturados de mesmo tamanho de cadeia, e portanto lipossomas formados por lipídios que os contenham, encontram-se na fase líquido cristalina em temperatura ambiente e corporal (Yagle, 2005).

Os lipossomas possuem propriedades biológicas atraentes como biocompatibilidade, facilidade de encapsular fármacos hidrofílicos em seu compartimento aquoso e fármacos hidrofóbicos em sua membrana, são capazes de proteger o fármaco de inativação por agentes externos e não causam efeitos colaterais indesejáveis (Torchilin, 2005).

Os lipossomas são reconhecidos como potenciais carreadores de fármacos para medicamentos de uso tópico, pois melhoram a biodisponibilidade, diminuem a degradação do ativo no interior da pele e reduzem a toxicidade sistêmica e local dos fármacos. Diversos compostos têm sido encapsulados em lipossomas e testados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para avaliar a biodisponibilidade e o grau de penetração na pele (Potts & Guy, 1992).

A primeira investigação da aplicabilidade de lipossomas no intuito de aumentar a concentração do fármaco na pele e diminuir sua absorção sistêmica foi descrito por Mezei & Gulasekharam em 1980. Eles descreveram um aumento da concentração de acetona de triancinolona na derme e epiderme e diminuição da concentração sistêmica em formulações contendo o fármaco encapsulado em lipossomas quando comparado com uma loção controle (Mezei & Gulasekharam, 1980).

Patel avaliou formulações contendo metotrexato livre e lipossomal e observou que esta última provocou um aumento de duas a três vezes na quantidade de fármaco retido na pele e diminuição da absorção sistêmica (Patel, 1985).

Touitou e colaboradores (1994) avaliaram formulações de cafeína encapsuladas em lipossomas compostos de fosfatidilcolina e colesterol na proporção (50:1) e diâmetro de 40 nm e em uma solução aquosa contendo mistura de promotores de absorção (Transcutol 20% e ácido oléico 10%). Os autores observaram acúmulo de cafeína na pele de ratos *in vitro* 3 vezes maior para formulação lipossomal, quando comparada à formulação contendo promotores de absorção.

Fresta & Puglisi (1996), investigaram a permeação cutânea de inulina encapsulada em lipossomas de diferentes tamanhos e composições e concluíram que os lipossomas compostos por lipídios semelhantes aos que compõem o estrato córneo, permearam melhor através da epiderme e derme, além de evitar a absorção sistêmica do fármaco em estudo.

O potencial dos anestésicos locais lipossomais em promover anestesia quando aplicados em pele intacta também têm sido extensivamente investigado (Foldvari et al, 1990a; Foldvari et al, 1990b; Hung et al., 1997; Bucalo et al., 1998; Fisher et al., 1998; Eichenfield et al., 2002; Koh et al., 2004; Sinico & Fada, 2009).

Em decorrência da sua natureza anfifílica, os anestésicos locais interagem com esses sistemas modelo de membrana na região da bicamada lipídica e na fase aquosa interna dos lipossomas (de Paula & Schreier, 1995, de Araújo et al., 2008a).

Em 1988, Gesztes & Mezei relataram prolongamento no efeito anestésico promovido pela tetracaína encapsulada em lipossomas, quando comparada à uma formulação comercial do mesmo anestésico após aplicação tópica em pele de voluntários.

Em 1990a, Foldvari e colaboradores estudaram o destino e o efeito anestésico da lidocaína encapsulada em lipossomas, após a aplicação tópica sobre a pele. A lidocaína lipossomal aplicada por uma hora no antebraço de voluntários humanos induziu anestesia superficial significativamente melhor do que na forma de creme não lipossomal. Uma autorradiografia demonstrou maior concentração de ¹⁴C-lidocaína na epiderme e na derme de cobaias tratadas com lidocaína encapsulada em lipossomas do que a lidocaína em Dermabase[®], creme não lipossomal.

Para aplicação tópica em pele humana, há relatos de que a encapsulação em lipossomas de anestésicos locais como tetracaína (Hung et al., 1997; Fisher et al., 1998;) e lidocaína (Bucalo et al., 1998; Eichenfield et al., 2002; Koh et al., 2004) promoveram maior eficácia e segurança clínica se comparados a formulações não-lipossomais.

A superioridade da eficácia tópica de formulações de anestésicos locais lipossomais sobre as formulações convencionais foi demonstrada também por vários outros autores e vem sendo avaliada em muitas investigações (Sharma et al., 1994; Singh & Vyas, 1996; Taddio et

al., 2005; Mura et al., 2007; Elsaie & Baumann, 2008; Franz-Montan et al., 2007, 2010a, 2010b; 2012)

1.4. LIPOSSOMAS ELÁSTICOS

Apesar das formulações em creme de lipossomas convencionais terem demonstrado maior efetividade quando comparadas às formulações não lipossomais, ao serem aplicadas topicamente na pele, vários estudos têm demonstrado que esses carreadores são pouco efetivos em pele intacta, uma vez que não penetram profundamente na derme, permanecendo nas camadas mais superficiais do estrato córneo (Cevc, 1996; Tuitou et al., 2000; Elsayed et al., 2007; Mishra et al., 2007).

Vários métodos têm sido avaliados em busca de um aumento na taxa de permeação de compostos ativos através da pele, sendo uma das abordagens a aplicação de medicamentos encapsulados em lipossomas elásticos. A fim de desvendar os mecanismos envolvidos no aumento do transporte do fármaco através da pele é muito importante a obtenção de informações sobre o efeito das vesículas na taxa de permeação, a via de permeação e perturbações na ultra-estrutura da pele (Bouwstra & Honeywell-Nguyen, 2002).

Além das características principais dos sistemas de liberação sustentada como o de carrear o composto funcional ao local de ação desejado, protegê-lo contra o metabolismo e modular a liberação dos compostos encapsulados, um sistema de liberação utilizado para via transdérmica deve ser capaz de permear o estrato córneo em direção às camadas mais profundas da pele (Santana & Zanchetta, 2011).

Um novo tipo de vesículas lipídicas tem sido estudado, nas quais as lamelas encontram-se no estado líquido cristalino, apresentando elasticidade. Quando aplicadas na pele, essas vesículas são capazes de se deformar, facilitando sua penetração através do estrato córneo, aumentando assim a taxa de permeação transdérmica de fármacos por ela carregados (Bouwstra et al., 2002).

Lipossomas elásticos são vesículas semelhantes aos lipossomas convencionais, consistindo de um compartimento interno aquoso rodeado por uma bicamada lipídica com propriedades especiais (Figura 5).

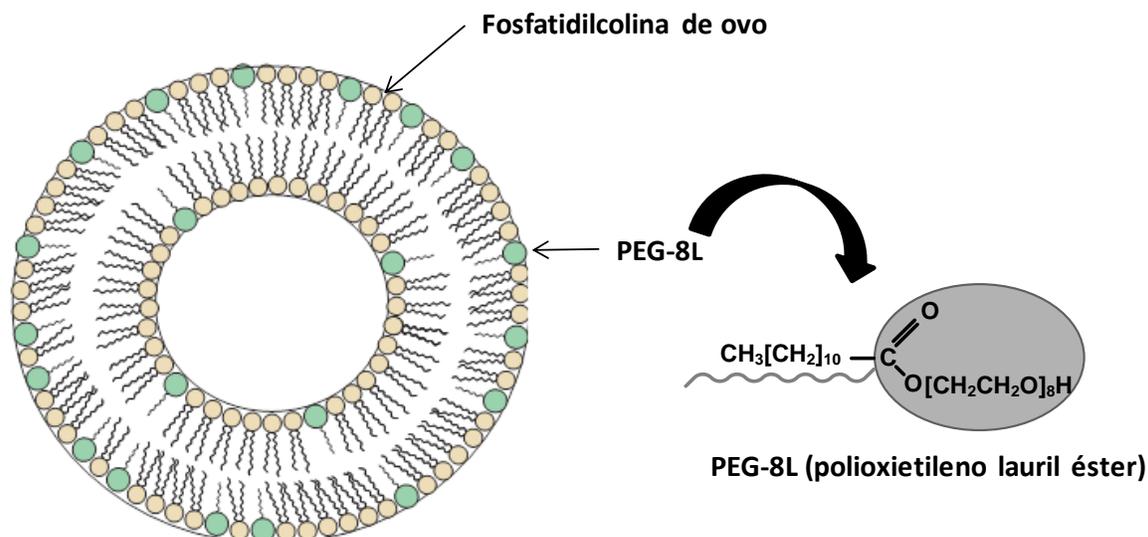


Figura 5. Esquema de um lipossoma elástico formado por moléculas de fosfatidilcolina de ovo e polioxietileno lauril éster (PEG 8-L).

Os primeiros lipossomas elásticos, denominados Transfersomes[®], foram descritos por Cevc & Blume (1992) e eram constituídos de lipídios sintéticos ou naturais aliados a uma pequena quantidade de colato de sódio, um surfatante que conferia elasticidade a estas vesículas, pois promovia a desestabilização da bicamada.

Foi demonstrado que os Transfersomes[®] eram capazes de encapsular compostos acomodados em seu interior aquoso ou particionados em sua bicamada, e transportar fármacos através da pele, por serem suficientemente flexíveis e capazes de atravessar poros, mesmo sensivelmente menores do que seu próprio tamanho devido a sua capacidade de deformação, possibilitada pela associação entre o surfatante e os fosfolipídios. O mecanismo sugerido para este transporte transdérmico seria a retração e deformação (conforme demonstrado na Figura 6) das vesículas elásticas e sua penetração através da pele em busca das camadas mais profundas e úmidas, em decorrência de uma força de hidratação, o que possibilita o transporte do fármaco na direção desejada (Planas et al., 1992; Cevc & Blume, 1992; Cevc et al., 1998).

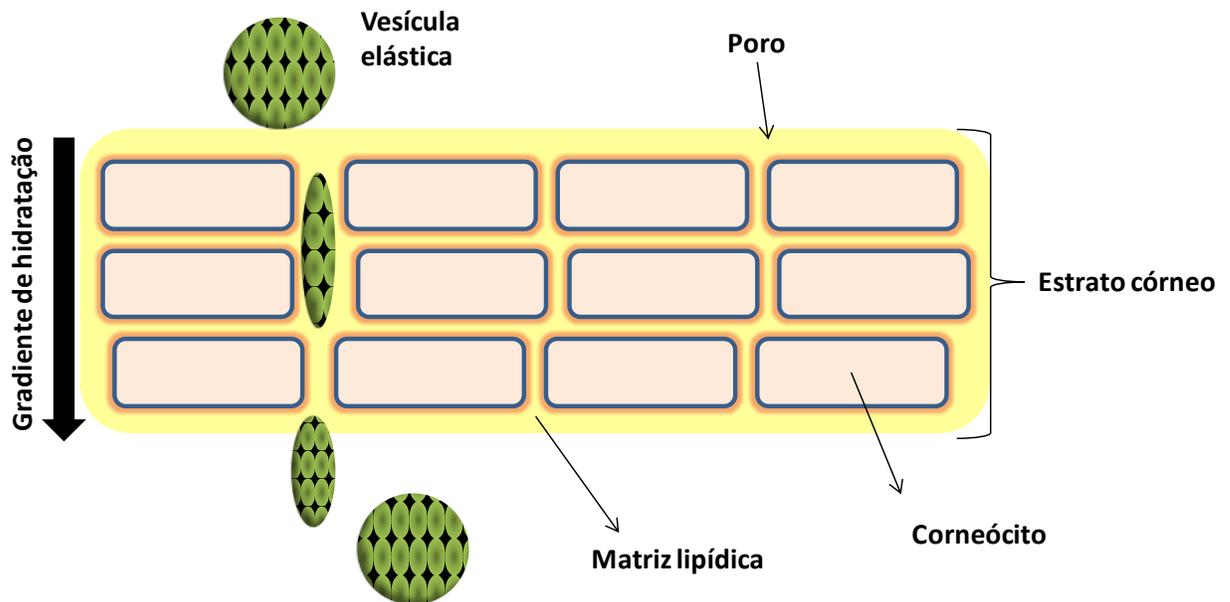


Figura 6. Deformação de lipossomas elásticos durante a penetração entre os poros intercelulares da pele.

Vesículas elásticas compostas de fosfatidilcolina de soja e colato de sódio foram avaliadas como carreadores transdérmicos para insulina, tal que após 90 a 180 min da administração tópica desta formulação, surgiram os primeiros sinais de hipoglicemia sistêmica, enquanto que os outros dois grupos testados (insulina encapsulada em lipossomas convencionais e uma suspensão composta de fosfatidilcolina e sal biliar) falharam na indução da hipoglicemia. O efeito da insulina encapsulada em Transfersomes[®] mostrou-se semelhante em ratos, suínos e humanos (Cevc et al., 1998).

El Maghraby e colaboradores (1999) demonstraram que os lipossomas elásticos compostos de fosfatidilcolina e colato de sódio foram capazes de aumentar a permeação do estradiol através da pele, em relação aos lipossomas convencionais. A adesão, fusão e penetração dos lipossomas no estrato córneo foi observada, com penetração potencialmente mais profunda das vesículas deformáveis, em comparação com lipossomas tradicionais. No entanto, esses autores não conseguiram comprovar que os lipossomas elásticos permearam intactos a pele humana.

Em 1999, van Der Bergh e colaboradores descreverem uma vesícula elástica composta por um surfatante não iônico. Esta vesícula elástica era formada por um anfifílico formador de bicamada (L-595- sacarose-lauril éster) usado como agente estabilizador e um surfatante capaz de se organizar na forma de micelas (PEG-8-L octaoxietileno lauril éster), usado como agente desestabilizador da bicamada aumentando a elasticidade das vesículas. A interação

dessas vesículas elásticas em pele de ratos foi comparada com vesículas rígidas contendo o surfatante estearato de sacarose (Wasag-7). O tratamento da pele de ratos com as vesículas elásticas alterou a estrutura do estrato córneo dos animais, onde foi observado a presença de material proveniente das vesículas elásticas. Este material provocou ruptura da organização das bicamadas da pele aumentando a sua permeabilidade. O tratamento com vesículas rígidas Wasag-7 não afetou a estrutura ou a permeabilidade da pele (van der Bergh, 1999a).

Honeywell-Nguyen e colaboradores realizaram testes *in vitro* e *in vivo* da interação dessas vesículas elásticas de L-595/PEG-8-L com a pele humana e observaram, através da técnica de *tape stripping* e microscopia eletrônica de crio-fratura da membrana, que essas vesículas penetram mais rapidamente no estrato córneo que vesículas “rígidas” (compostas somente de L-595). Após 1h de aplicação sem oclusão, as vesículas elásticas foram observadas intactas nas camadas profundas do estrato córneo e estavam acumuladas em estruturas com aparência de canal (“channel-like”) localizadas nas lamelas lipídicas dos espaços intercelulares (Honeywell-Nguyen et al., 2002).

Os lipossomas elásticos têm sido usados no mercado como sistemas de liberação sustentada para medicamentos transdérmicos tanto de moléculas de tamanho pequeno como os corticosteróides (Cevc et al., 1997), quanto de tamanho relativamente grande, como a insulina (Cevc et al., 1998) e a albumina sérica bovina (Paul et al., 1995, Paul & Cevc, 1995). Para esses medicamentos já foram realizados experimentos pré-clínicos em animais como camundongos, ratos e porcos, e também estudos clínicos de fase I e fase II (Purdon et al., 2004).

No primeiro estudo relatando o uso de anestésicos locais carregados por vesículas elásticas, foi demonstrado que essas vesículas penetram rapidamente através da epiderme intacta e, dependendo de sua composição, tamanho e concentração, podem chegar ao tecido subcutâneo bloqueando as terminações nervosas e funções de nociceptores (Planas et al., 1992). Estes autores demonstraram que a aplicação tópica de tetracaína a 4% e lidocaína a 7% encapsuladas em Transfersomes[®], mesmo na ausência de promotores de absorção prolongaram o efeito anestésico em comparação com a injeção dos anestésicos livres. Assim, concluíram que a eficácia da aplicação tópica dos anestésicos foi similar à injeção subcutânea dos mesmos fármacos, com a vantagem de ser uma alternativa não invasiva no tratamento da dor (Planas et al., 1992).

Uma variação de vesículas flexíveis, chamadas de Ethosomes[®], compostas de fosfatidilcolina (2-5%), etanol (20-50%) e água, demonstraram maior eficiência de penetração na pele em termos quantitativos e de profundidade. O sistema etossomal aumentou

significativamente a permeação transdérmica de minoxidil *in vitro*, quando comparado com a solução etanólica, hidroalcoólica e suspensão micelar etanólica de fosfolipídios com o mesmo fármaco (Touitou et al., 2000). *Patches* etossomais de testosterona também mostraram maior liberação do fármaco através da pele, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, quando comparados aos *patches* comerciais, contendo testosterona não encapsulada (Touitou et al., 2000).

Formulações lipossomais de benzocaína para uso tópico com vesículas multilamelares e unilamelares utilizando a combinação de fosfatidilcolina e colesterol (1:1 mol%) como fase lipofílica e etanol:água (1:1 v:v), como fase hidrofílica foram avaliadas. A permeação da benzocaína a partir das suspensões lipossomais incorporadas em formulações de gel de Carpobol[®] foi avaliada através de membrana artificial lipofílica e em pele abdominal de ratos. Além disso, estas formulações foram testadas quanto à eficácia *in vivo* em promover anestesia tópica em ratos. Todas as formulações lipossomais testadas apresentaram propriedades de liberação sustentada e um efeito anestésico mais intenso e prolongado, quando comparado ao fármaco livre. As formulações contendo vesículas multilamelares com adição do fármaco na fase hidrofílica demonstraram ser as mais efetivas, tendo apresentado coeficiente de permeabilidade 2,5 vezes maior que as formulações contendo benzocaína não encapsulada (Mura et al., 2007).

Posteriormente, visando otimizar as formulações lipossomais de benzocaína descritas acima, o mesmo grupo de pesquisadores propôs diversas formulações com o uso de glicirizinato de potássio como alternativa ao uso de colesterol na fase lipídica e a adição de estearilamina (catiônica) ou dicetilfosfato (aniônico) como surfatantes. A quantidade de etanol e o volume total da fase de hidratação foram as variáveis avaliadas da fase aquosa. A formulação que apresentou maior porcentagem de benzocaína permeada foi a composta de colesterol e dicetilfosfato com 96% de etanol e 3 mL de água. Os autores compararam esta formulação com a lipossomal descrita no estudo anterior (Mura et al., 2007) em estudos de permeação *in vitro* através de pele de ratos e atividade anestésica *in vivo* em aplicação tópica intra ocular em coelhos demonstrando maior permeação e melhor desempenho anestésico da nova formulação lipossomal elástica proposta (Mura et al., 2008).

Mais recentemente, a influência de diferentes condições de preparo dos Ethosomes contendo benzocaína foi avaliada quanto à permeação em membrana lipofílica *in vitro*, e à atividade anestésica tópica em coelhos *in vivo*. Vesículas multilamelares (MLV) e unilamelares de tamanho grande (LUV) apresentaram maior porcentagem de encapsulação, estabilidade e taxa de permeação que vesículas pequenas. Além disso, essas formulações apresentaram melhor eficácia anestésica tópica (Maestrelli et al., 2009).

A tabela 1, traz um um breve resumo das diferentes vesículas elásticas descritas na literatura.

Tabela 1. Formulações de lipossomas não convencionais discutios na literatura

Nome	Desestabilizador	Proporção lipídio/desestabilizador	Referência
Transfersomes [®]	Colato de sódio	Colato de sódio/Fosfatidilcolina 15/4 mol%)	Cevc & Blume, 1992; Cevc et. al, 1998
Transfersomes [®]	Polissorbato	Fosfatidilcolina de soja/polissorbato(2/1 mol/mol)	Cevc et. al, 1996, Fesq, 2003
Niosomes [®]	octaoxietileno lauril ester (PEG-8L)	L-595 ester de sucrose/octaoxietileno lauril ester/sulfato de colesterol (14/6/1 mol%)	van den Bergh et. al, 1999; Honeywell-Nguyen et al, 2002
Ethosomes [®]	Etanol	Fosfatidilcolina/etanol (2 a 5%/20 a 50%)	Touitou et al., 2000

1.5. ANESTESICOS LOCAIS

Apesar dos recentes avanços na investigação de novos agentes terapêuticos, o controle da dor ainda é um desafio (Cavalcante, 2004). Anestésicos locais estão entre as diferentes classes de compostos farmacológicos utilizados para atenuar ou eliminar a dor.

O primeiro anestésico local descrito foi a cocaína, extraída das folhas de *Erythroxylon coca*, por Nieman, em 1860, na Alemanha, que constatou que a mesma causava entorpecimento da língua (Catterall & Mackie, 1996). No início, a cocaína foi considerada um fármaco milagroso, sendo prescrita para inúmeras enfermidades particularmente difíceis de serem tratadas. Em 1884, o neurologista Sigmund Freud publicou um livro chamado “Über coca”, o qual contribuiu para a divulgação do uso clínico da cocaína. Neste livro foram descritas várias aplicações da droga, como estimulante, afrodisíaco, anestésico local, tratamento de asma, doenças consumptivas, desordens digestivas, exaustão nervosa, histeria e sífilis (Moriarty, 1984; Haas, 1995). Porém, após quatro anos de sua publicação original, Freud voltou atrás, rendendo-se às evidências de que a “droga milagrosa” tinha uma série de inconvenientes, especialmente pelo seu potencial de criar dependência. Em 1892, Freud publicou uma continuação de “Über coca”, modificando seu ponto de vista, originalmente favorável à cocaína (Ferreira & Martini, 2001).

A indústria farmacológica concentrou-se na análise de produtos naturais, a fim de encontrar um medicamento substituto para a cocaína. Esta estratégia levou ao isolamento da tropocaina, em 1891. No entanto, esta substância demonstrou ter um grau de toxicidade semelhante ao da cocaína. Novas substâncias foram então, preparadas através de modificações estruturais desses anestésicos locais conhecidos. Esta pesquisa forneceu, em um curto período de tempo, a eucaína, a holocaína e o ortoforme. Em 1898, Eihorn sintetizou o primeiro anestésico local do tipo amino-amida, a nirvaquina, que mostrou-se irritante aos tecidos e parou de ser utilizada muito cedo. Este mesmo autor sintetizou, então, anestésicos locais do tipo éster (a benzocaína, em 1900) e amino-éster (a procaína, em 1905), que são utilizados até os dias de hoje (Ruetsch et al., 2001).

Os anestésicos locais de uso clínico nos dias de hoje, podem ser classificados como compostos amino-ésteres ou amino-amidas (Strichartz, 1987; McLure & Rubin, 2005). Os agentes que possuem uma ligação éster entre o grupo aromático e a cadeia intermediária são denominados amino-ésteres (Figura 7) e incluem compostos como a procaína e tetracaína (Carvalho, 1994).

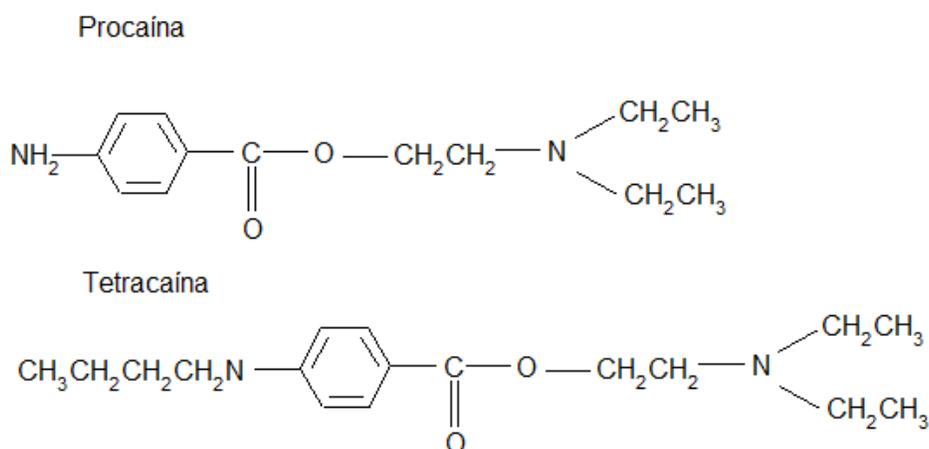


Figura 7. Estrutura química dos anestésicos locais do tipo amino-éster - procaína e tetracaína

Já os anestésicos locais com uma ligação amida entre a cadeia intermediária e o grupamento aromático são conhecidos como amino-amidas (Figura 8). Como exemplo dessa família tem-se a prilocaína, a lidocaína, a ropivacaína e a bupivacaína, entre outros (Malamed, 2006).

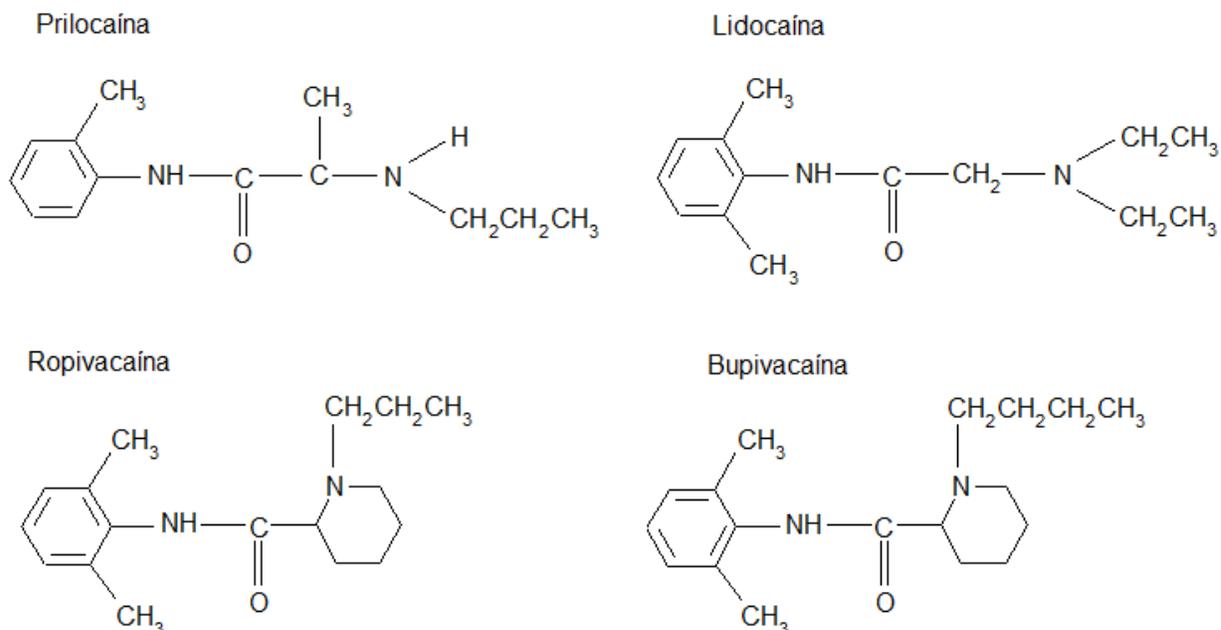


Figura 8. Estrutura química dos anestésicos locais do tipo amino-amida - prilocaína, lidocaína, ropivacaína e bupivacaína

Embora os anestésicos locais possam ser produzidos a partir de muitas bases amínicas terciárias, de certos alcoóis (Gupta, 1991) e de uma variedade de compostos naturais com propriedades anestésicas (por ex. toxinas batracotoxina, brevetoxina, ciguatoxina) (Cestèle & Catterall, 2000; Duclouhier, 2009; Pérez et al., 2011) a maioria dos agentes clinicamente úteis são do tipo amino-éster ou amino-amida. Estes fármacos, quando aplicadas em concentração suficiente no sítio de ação, previnem a condução de impulsos elétricos nas membranas de nervos e de músculos (Strichartz, 1987).

A natureza da ligação é importante para definir inúmeras propriedades do anestésico local, incluindo sua biotransformação (Malamed, 2006).

Os ésteres são biotransformados rapidamente no plasma, pelas colinesterases plasmáticas, enquanto que as amidas dependem de biotransformação pelos microsossomos hepáticos. O ácido para-aminobenzóico é um dos metabólitos de compostos do tipo éster que está associado à reações alérgicas nos pacientes. As amino-amidas não são metabolizadas em ácido para-aminobenzóico e os relatos de reações alérgicas a estes agentes são extremamente raros (Covino, 1986; Strichartz, 1987).

Um efeito colateral sistêmico associado com um agente anestésico local específico é a metahemoglobinemia que pode ocorrer após administração de grandes doses de prilocaína. Esta condição é desencadeada após a metabolização da prilocaína no fígado, onde ocorre a formação do metabólito orto-toluidina, o qual promove um aumento da oxidação da hemoglobina à metahemoglobina, incapaz de carrear O₂, diminuindo a oxigenação dos tecidos. A metahemoglobinemia associada com a prilocaína é espontaneamente reversível, ou pode ser revertida pela administração endovenosa de azul de metileno (Strichartz, 1987).

Os anestésicos locais interferem no processo de excitação da membrana nervosa de uma ou mais maneiras: alterando o potencial de repouso básico da membrana nervosa, alterando o potencial limiar, diminuindo a velocidade da despolarização ou ainda prolongando a velocidade da repolarização agindo sobre os canais de sódio voltagem-dependente (Malamed, 2006). O bloqueio da condução do impulso nervoso através da inibição do influxo de sódio nos canais voltagem-dependentes aumenta o limiar de excitabilidade da célula nervosa até a perda da capacidade de gerar o potencial de ação. Assim, anestésicos locais bloqueiam o disparo ou a propagação do impulso nervoso. No caso dos anestésicos locais administrados por via tópica, esses previnem a geração e transmissão dos impulsos dolorosos nas terminações livres localizadas na derme e promovem analgesia cutânea (Friedman et al., 2001).

As propriedades clinicamente importantes para os anestésicos locais incluem potência, tempo de latência, duração da ação anestésica e bloqueio sensorial/motor diferencial (Strichartz, 1987; Carvalho, 1994). Os anestésicos locais variam em seus efeitos clínicos e essas diferenças dependem de sua estrutura química, onde cada porção da estrutura química do anestésico confere uma característica, como escrito a seguir (Carvalho, 1994):

- Radical aromático: é a porção lipossolúvel do anestésico, responsável por sua penetração na membrana do nervo. Entre os exemplos de radicais aromáticos estão o ácido benzóico (cocaína, benzocaína), o ácido para-aminobenzóico (procaína, cloroprocaína) ou a xilidina (lidocaína, bupivacaína) (Carvalho, 1994).
- Cadeia intermediária: é o esqueleto da molécula do anestésico. Variações da cadeia intermediária influem tanto na potência como na toxicidade dos anestésicos locais (Carvalho, 1994).
- Grupo amina: é a porção ionizável da molécula, que vai sofrer a influência do pH do meio e, portanto, pode ser manipulada de forma a favorecer a prevalência do anestésico ionizado (com grupo amina protonado, NH₃⁺) ou neutro (NH₂) (Strichartz, 1987; Strichartz et al., 1990). A desprotonação deste grupo amino (em pH acima do seu

pKa) também aumenta a hidrofobicidade da molécula uma vez que a forma neutra tem maior partição em membranas biológicas. A prevalência das formas protonada ou neutra determina, entre outras coisas, a velocidade de ação do anestésico local (Carvalho, 1994).

As características lipofílicas ou hidrofílicas da molécula do anestésico local podem ser afetadas pela alteração do tamanho da substituição da cadeia alquílica próximo à amina terciária ou grupo aromático. Através de um aumento do tamanho da substituição da alquila, são obtidos compostos com maior hidrofobicidade. Quando a lipofilicidade é maior, o anestésico pode atravessar a membrana nervosa com mais facilidade, sendo mais potente e produzindo bloqueio de duração maior que anestésicos menos hidrofóbicos (Strichartz, 1987; Gupta, 1991, de Jong, 1994; McLure & Rubin, 2005).

A etidocaina, por exemplo, possui três átomos de carbono a mais na porção amino terminal da molécula que a lidocaína, e é quatro vezes mais potente e com duração de ação cinco vezes mais longa, quando eles são comparados no bloqueio do nervo ciático isolado de sapo (Strichartz, 1987). A hidrofobicidade também aumenta a toxicidade, reduzindo o índice terapêutico dos AL mais hidrofóbicos (Catterall & Mackie, 1996).

A maioria dos anestésicos locais de uso clínico são bases fracas, que possuem alto valor de pKa (Tabela 2). A forma neutra tem menor solubilidade em água e por isso, os anestésicos locais são comercializados na forma de cloridrato, formando soluções ácidas (pH 3 a 6) em que predomina a forma catiônica, mais solúvel (McLure & Rubin, 2005).

Os anestésicos precisam se difundir através das membranas para atingir seu local de ação. Acredita-se que eles só podem fazê-lo na forma não carregada. Como muitos anestésicos locais tem pKa maior que o pH fisiológico, isso favorece a formação da espécie ionizada, e conseqüentemente uma redução na quantidade disponível para bloqueio do nervo diminui (Gupta, 1991; McLure & Rubin, 2005).

Ao contrário, agentes com pKa abaixo do pH fisiológico, estarão na forma não ionizada nos tecidos, o que favorece sua partição nas membranas fisiológicas, aumentando a velocidade de início de ação (Gupta, 1991).

Tabela 2. Características físico-químicas e farmacológicas dos anestésicos locais.

Anestésico	Peso Molecular (g/mol)	pKa (25°C)	Velocidade de início de ação	Ligação à proteínas (%)	Coefficiente de partição*	Potência**
<i>Amino-ésteres</i>						
Cocaína	303	8,7	Lento	98	-	-
Procaína	236	9,0	Lento	6	1,7	1
Tetracaína	264	8,6	Lento	76	221	16
<i>Amino-aminas</i>						
Lidocaína	234	7,7	Rápido	64	43	4
Mepivacaína	246	7,9	Lento	77	21	2
Bupivacaína	288	8,1	Lento	95	346	16
Ropivacaína	274	8,1	Lento	94	115	-
Prilocaina	220	7,9	Rápido	55	25	3

(McLure e Rubin, 2005)

* Coeficiente de partição octanol/água medido em pH 7,4 a temperatura ambiente (Strichartz et al 1990);

** Concentração para bloqueio relativamente a da Procaína (de Araújo et al, 2008a)

Devido à sua hidrofobicidade, os anestésicos locais têm grande interação com proteínas plasmáticas. O grau de ligação do anestésico com as proteínas está diretamente relacionado com a duração da atividade anestésica. Acredita-se que anestésicos mais lipofílicos (que possuem maior afinidade por proteínas plasmáticas) também apresentam uma interação maior com os sítios de ação na proteína-canal de sódio e, por isso, permanecem mais tempo no canal, o que resulta em uma duração maior da atividade anestésica (Malamed, 2006; McLure & Rubin, 2005).

1.6. BENZOCAINA

A benzocaína (BZC), cuja estrutura química está ilustrada na Figura 9, é um anestésico local do tipo amino-éster que, diferentemente da maioria dos anestésicos locais, não apresenta na sua extremidade terminal um grupo amino (Fraceto et al., 2006). O pka do grupamento

amina ligado em posição para ao anel benzóico é 2,4 o que faz com que a BZC permaneça em sua forma neutra e não se ionize no pH fisiológico (Fraceto et al., 2006).

A BZC apresenta massa molecular de 165 g/mol e coeficiente de partição octanol/água de 81 (medido em pH 7,4 a temperatura ambiente). Possui baixa solubilidade em água, o que determina sua aplicação principalmente em formulações de uso tópico, dérmico e em mucosas (Strichartz et al 1990; Malamed, 2006; Mura et al., 2007; de Araújo et al., 2008a).

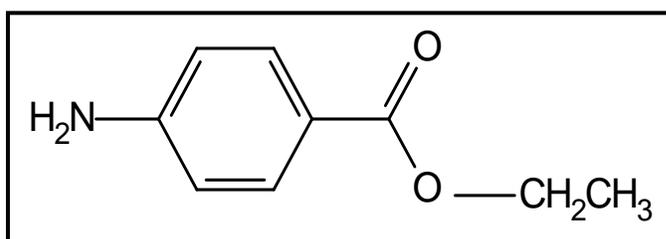


Figura 9. Estrutura química da benzocaína.

A BZC produz inibição tônica dos canais de sódio, com pouco ou nenhum bloqueio dose dependente durante repetitivas despolarizações, este bloqueio é favorecido quando o canal está aberto ou em seu estado inativo (Fraceto et al., 2006). Como principais características, a BZC possui um rápido início de ação, porém com curta duração, quando comparada com o potencial de duração da dor (Covino & Vassalo, 1976)

Este anestésico local possui baixa absorção e baixa toxicidade ao sistema cardiovascular, porém efeitos adversos como a metahemoglobinemia foram associados à sua absorção sistêmica (Martin et al. 1995; Sachdeva et al., 2003; Dahshan & Donovan, 2006). Embora o metabólito responsável por causar a metahemoglobinemia não tenha sido identificado, sugere-se que seja o derivado n-hidroxilado de sua metabolização. A benzocaína, por apresentar uma ligação éster em sua molécula, é rapidamente hidrolisada pelas esterases plasmáticas formando o ácido p-aminobenzóico (PABA) e etanol. O PABA pode sofrer uma n-hidroxilação formando n-hidroxi PABA, o qual pode oxidar a hemoglobina em metahemoglobina (Martin et al., 1995). A formação do PABA também pode levar à reações alérgicas localizadas, em caso de uso prolongado e repetido (Malamed, 2006).

A benzocaína foi o primeiro anestésico local a ser usado de forma tópica e, ainda hoje, é o mais utilizado por esta via. No entanto, o uso deste anestésico na forma tópica é restrito às mucosas, visto que sua capacidade de atravessar o estrato córneo é limitado. A primeira formulação de liberação sustentada de uso tópico empregou a benzocaína e foi descrita em

1940 e até os anos 70 a benzocaína foi o único anestésico local mencionado em patentes (de Paula et al., 2010).

Em estudos anteriores de nosso laboratório caracterizamos a interação da BZC com lipossomas convencionais, compostos de fosfatidilcolina de ovo (EPC) (Pinto et al., 2000) ou EPC, colesterol e alfa-tocoferol na proporção 4:3:0,07 mol% (Pinto, 2002). Posteriormente foi demonstrado, que formulações em gel de BZC a 10%, encapsulada nesses lipossomas (compostos de EPC, colesterol e alfa-tocoferol) foram capazes de reduzir a dor à punção na mucosa oral de voluntários sadios, quando comparadas à formulação comercial de gel de benzocaína com o dobro da concentração (20%) (Franz-Montan et al., 2010b).

O desenvolvimento de formulações lipossomais de benzocaína para uso dérmico pode permitir o uso de menores concentrações deste anestésico local, reduzindo sua toxicidade e melhorando sua estabilidade química e propriedades anestésicas. Além disso, a encapsulação da benzocaína em lipossomas elásticos pode ser ainda mais promissora para aplicação transdérmica, já que tais lipossomas deformáveis são capazes de aumentar consideravelmente a penetração de diversos fármacos, inclusive a benzocaína através da pele (Mura et al., 2008).

Por estas razões e devido ao fato de não existir comercialmente uma formulação lipossomal de benzocaína, o desenvolvimento de um sistema de liberação sustentada destinado a modular a liberação da BZC, reduzindo sua absorção sistêmica, aumentando sua penetração transdérmica e conseqüentemente, seu efeito anestésico pode ser muito vantajoso (Mura et al., 2007, Maestrelli et al., 2009) e justificam este trabalho.

II. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi preparar, caracterizar e avaliar a estabilidade e perfil de permeação de formulações em gel de benzocaína, livre ou encapsulada em lipossomas (convencionais e elásticos), para uso tópico, avaliando e comparando características de estabilidade das formulações.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Preparo e caracterização das suspensões lipossomais (lipossomas convencionais e elásticos) contendo benzocaína.
- ❖ Preparação de formulações farmacêuticas de benzocaína a 10 e 20% na forma de gel não lipossomal e gel lipossomal (lipossomas convencionais e elásticos).
- ❖ Avaliação da estabilidade físico-química das formulações, avaliando teor, pH e perda de peso, segundo o Guia para a realização de estudos estabilidade. (Brasil, 2005)
- ❖ Determinação de perfil reológico das formulações em gel e do grau de peroxidação lipídica dos lipossomas presentes nos géis lipossomais;
- ❖ Realização de testes de liberação e permeação através da pele comparando a liberação de benzocaína a partir das diferentes formulações com o gel comercial;
- ❖ Avaliação e comparação da citotoxicidade das formulações.

III. MATERIAIS & MÉTODOS

3.1. FÁRMACO, ADJUVANTES FARMACOTÉCNICOS E SOLVENTES

- ✓ Acetato de Uracila (Sigma Aldrich)
- ✓ Acetona P. A (Labsynth Ltda)
- ✓ Benzocaína (grau de pureza - 100%): (Sigma Aldrich)
- ✓ DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Nutricell)
- ✓ Gel comercial de Benzocaína a 20% (Benzotop® - DFL Ind Com Ltda,)
- ✓ Glicerina (Labsynth Ltda)
- ✓ β-Ciclodextrina (Roquette Serv. Tech. Lab.)
- ✓ Lipídios: fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma Aldrich)
- ✓ Metilparabeno (Nipagin® - NIPA)
- ✓ PEG-8L – polioxietileno lauril éster (Lipopeg® 4-L – LIPO Chemicals)
- ✓ Polímero Carboxivinílico (Carbopol Ultrez): Galena Química e Farmacêutica
- ✓ Propilenoglicol (Labsynth Ltda)
- ✓ Soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina (Cultilab)
- ✓ Trietanolamina (Labsynth Ltda)
- ✓ Outros: acetato de alfa-tocoferol (Sigma Aldrich), ácido acético glacial, clorofórmio e cloreto férrico (Labsynth Ltda), etanol (Ecibra Reag. Anal.), ácido tiobarbitúrico, glicina, butil-hidroxi-tolueno, dodecilsulfato de sódio Sigma Aldrich)

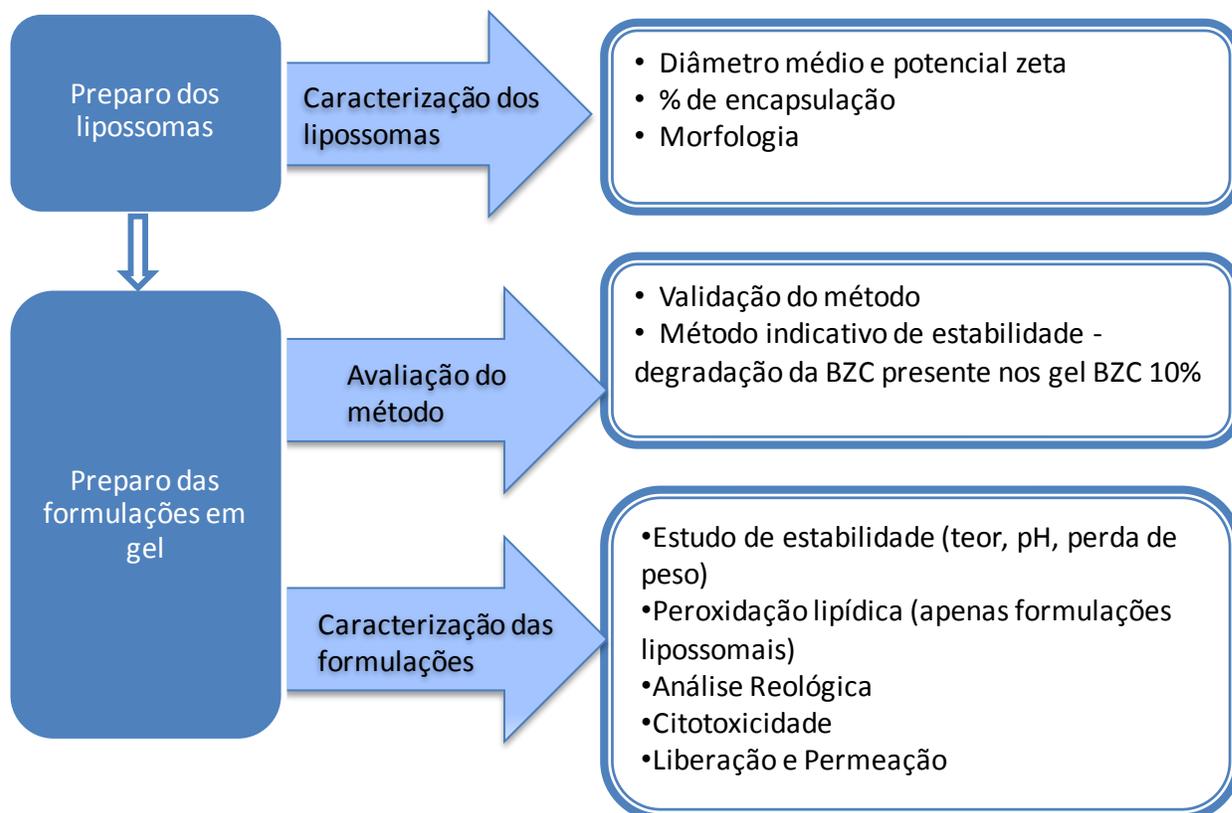
3.2. EQUIPAMENTOS

- ✓ Analisador de partículas modelo Zetasizer ZS 90 (Malvern®), Instituto de Engenharia, Unicamp;
- ✓ Agitador de tubos Phoenix® AP56
- ✓ Aparelho Rotovisco RV 20/CV 20, acoplado a computador (Thermo Scientific), Instituto de Química, Unicamp;
- ✓ Células de Franz ((Disa, Milano, I), adaptadas com área de permeação de 0,6cm²)
- ✓ HPLC (Lachrom Elite Merck);
- ✓ Extrusor (Lipex Biomembranes Inc.);
- ✓ Centrífuga MC 12 V – Sorval;
- ✓ Microscópio eletrônico de transmissão, Zeiss – LEO 906,

✓ Vórtex

3.3. METODOLOGIA

Os testes realizados neste trabalho estão representados no fluxograma abaixo. A metodologia utilizada em cada etapa está detalhada a seguir.



3.3.1. Preparo das Formulações:

3.3.1.1. Preparo dos lipossomas convencionais (LC)

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação de filme seco, a partir de alíquotas de fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol e α -tocoferol na proporção molar de 4:3:0,07 (em solução estoque em clorofórmio) para concentração lipídica final de 20 mM (EPC: colesterol). O solvente orgânico foi evaporado sob fluxo de N_2 , seguido de vácuo (350 mmHg), em temperatura ambiente, para a retirada do solvente residual, formando-se um filme lipídico seco na parede dos tubos (de Araújo et al., 2004, 2008b). Após a secagem foi adicionada água

deionizada (visto que a própria base da formulação farmacêutica é preparada nesse tipo de veículo) seguida de agitação em vórtex por 5 min, obtendo-se vesículas multilamelares.

As vesículas unilamelares de 100 nm (LUV) foram obtidas por extrusão da suspensão das vesículas multilamelares descritas acima. Assim, sob pressão de nitrogênio à temperatura ambiente, a suspensão contendo vesículas multilamelares foi impelida a passar por um disco de drenagem e através de uma membrana de policarbonato com poros de tamanho controlado (100 nm), por 12 vezes. Os lipossomas foram deixados em repouso, por cerca de 2 h, para o equilíbrio das vesículas. A incorporação do anestésico local foi realizada após a preparação das vesículas (incorporação ativa), para a concentração final desejada (10% e 20%). Resumidamente, o anestésico benzocaína foi previamente micronizado em gral de porcelana, com auxílio de um solvente orgânico (acetona) que foi, em seguida, evaporado em capela de exaustão por 8 horas. Após evaporação do solvente o anestésico foi macerado com 1% de propilenoglicol. O propilenoglicol foi usado com o intuito de reduzir ainda mais o tamanho das partículas do anestésico (BZC), formando uma pasta do material sólido, evitando aspereza na formulação. Após a levigação com o propilenoglicol, o anestésico foi colocado em contato com a suspensão de lipossomas convencionais, por um período mínimo de 2 h, para incorporação (Silva, 2007)

3.3.1.2. Preparo dos lipossomas elásticos (LE)

Os lipossomas elásticos foram preparados e caracterizados de acordo com o descrito pelo grupo de Santana (Zanchetta, 2009; Santana & Zanchetta, 2011). Os componentes dos lipossomas elásticos foram a fosfatidilcolina de ovo como agente estabilizador/formador de bicamada e o PEG-8-L (octaoxietileno lauril éster) como desestabilizador da bicamada, na razão molar 3:2. Um filme de fosfatidilcolina de ovo foi preparado, como descrito acima, para preparo de vesículas multilamelares de LC (item 3.3.1.1), para concentração lipídica final de 20 mM (EPC). As vesículas unilamelares 100 nm foram obtidas por extrusão. Em seguida para a preparação dos lipossomas elásticos, a suspensão lipossomal formada por EPC a 20 mM obtida na extrusão, foi incubada por 24 horas com o tensoativo PEG-8L, também a 20 mM, proporção (6:4 v/v). A incorporação do anestésico foi feita da mesma forma como descrito para os lipossomas convencionais (incorporação ativa -item 3.3.1.1) utilizando-se também 1% de propilenoglicol.

3.3.1.3. Preparo do gel

O preparo das formulações farmacêuticas seguiu as orientações da resolução “Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias (Brasil, 2007).

Inicialmente foi preparado um gel base conforme representado na figura 10, com os constituintes descritos na tabela 3. Em seguida, os géis lipossomais e não lipossomais foram preparados conforme descrito nos itens 3.3.1.4 e 3.3.1.5, respectivamente.

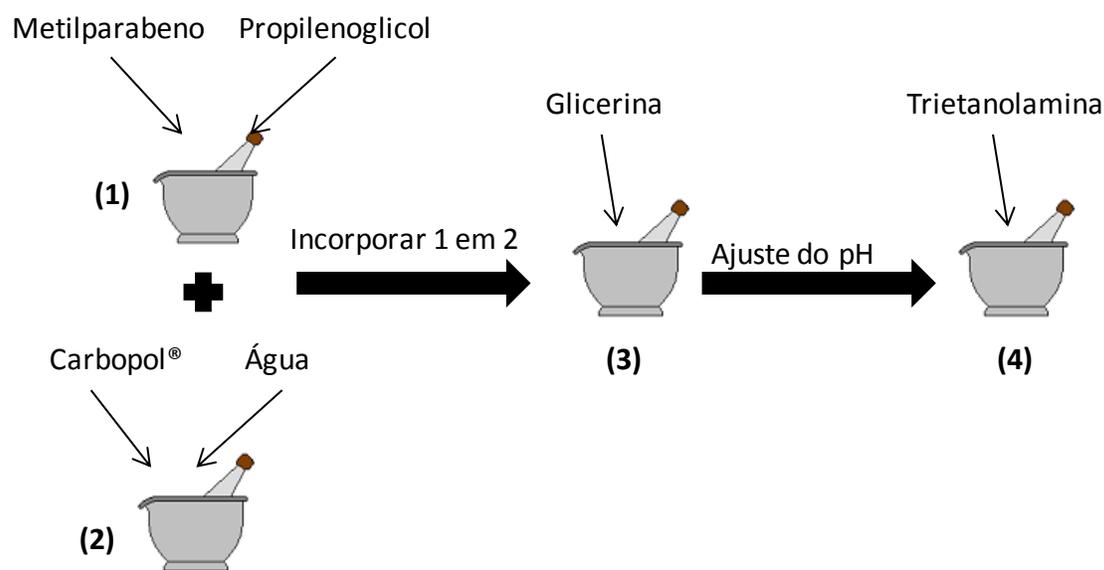


Figura 10. Representação esquemática do preparo do gel base

Tabela 3. Componentes utilizados no preparo do gel base.

Componente	Concentração	Função
Carbopol Ultrez®	2%	Agente gelificante de fácil dispersão
Propilenoglicol	5%	Solvente e umectante
Metilparabeno	0,1%	Conservante
Glicerina	8%	Agente umectante e emoliente
Trietanolamina	q.s.p pH 5,0	Agente alcalinizante
Água deionizada	q.s.p. 100 mL	Solvente

Os polióis, propilenoglicol e glicerina, utilizados na concentração de 5% e 8% respectivamente nesta formulação, conferem umectância ao gel, impedindo com que ele seque, melhorando sua consistência e aplicação na pele (Lachman et al., 2001)

3.3.1.4. Preparo dos géis lipossomais

O preparo dos géis lipossomais foi realizado de acordo com relatório de patente depositado por nosso grupo de pesquisa (Silva et al, 2008). As suspensões lipossomais descritas nos itens 3.3.1.1 e 3.3.1.2 foram incorporadas ao gel-base, preparado conforme descrito no item 3.3.1.3 para obtenção da forma farmacêutica desejada (Figura 11). Os géis lipossomais preparados foram os seguintes:

- ✓ Gel de BZC 10% encapsulada em lipossomas convencionais (BZC 10% LC);
- ✓ Gel de BZC 10% encapsulada em lipossomas elásticos (BZC 10% LE)

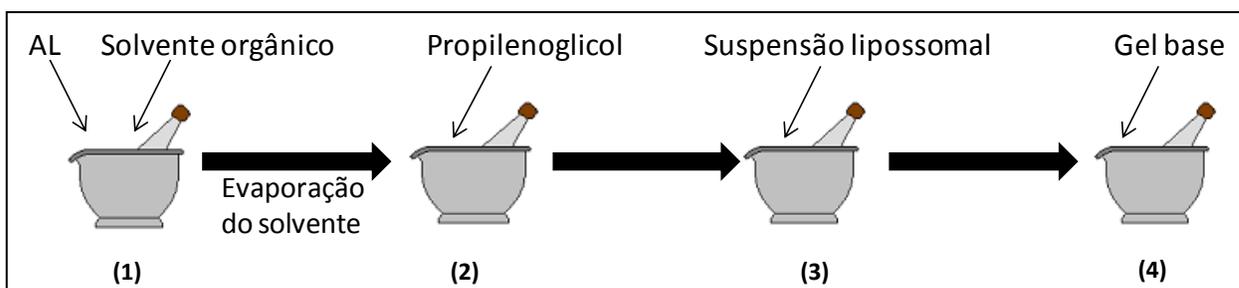


Figura 11. Representação esquemática do procedimento farmacotécnico de preparo das formulações de gel de benzocaína lipossomal.

3.3.1.5. Gel não lipossomal

No caso da preparação de gel sem lipossomas, o fármaco, previamente micronizado em solvente orgânico e levigado em propilenoglicol, foi incorporado diretamente aos componentes finais (Tabela 3) para obtenção do gel (Figura 12). Os géis não lipossomais avaliados foram:

- ✓ Gel de BZC 10% (BZC 10%);
- ✓ Gel de BZC 20% (BZC 20%)

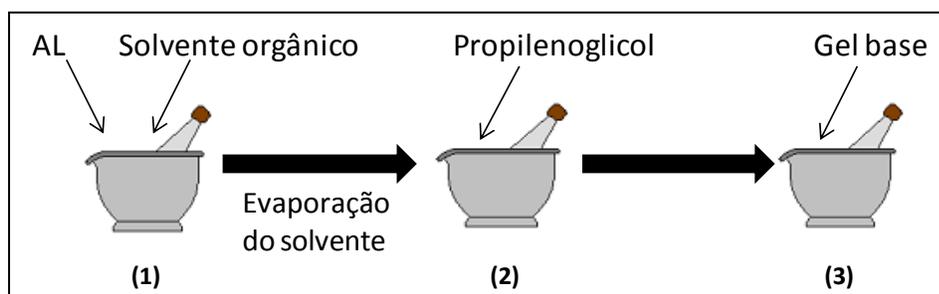


Figura 12. Representação esquemática do procedimento farmacotécnico de preparo das formulações de gel de benzocaína não lipossomal.

3.3.2. Caracterização dos lipossomas

3.3.2.1. Determinação do diâmetro médio das vesículas, por espalhamento dinâmico luz

O tamanho das vesículas foi determinado medindo-se seus raios hidrodinâmicos, por espectroscopia de espalhamento de luz dinâmico ou espectroscopia de correlação de fótons, obtida por incidência de raio laser (*dynamic light scattering*).

As medidas de espalhamento de luz são de grande valor na estimativa do tamanho e interação de partículas lipossomais e, além disso, a técnica oferece vantagens pela rapidez das medidas, não interfere no sistema e promove uma análise representativa das amostras, já que o número de partículas é relativamente grande (de Araújo, 2005).

O princípio da técnica considera que, quando um raio de luz é direcionado a uma dispersão coloidal ou suspensão, parte dessa luz pode ser absorvida, parte é dispersa e a restante é transmitida através da amostra. A luz dispersa ou “espalhada” resulta de um campo elétrico associado à luz incidente, induzindo oscilações periódicas na nuvem eletrônica dos átomos do material analisado, que são detectadas pelo aparelho ao longo de um intervalo de tempo (Shaw, 1991).

Partículas pequenas se movimentam mais rapidamente que partículas grandes, causando diferentes flutuações da radiação espalhada que chegam ao detector. Estas flutuações estão relacionadas ao coeficiente de difusão translacional (Dt), que, por sua vez, permite determinar o raio hidrodinâmico médio (R_h) das partículas, através da relação de Stokes-Einstein (Allen, 1997), demonstrada na equação 1:

$$Dt = \frac{kTR}{6\pi\eta Rh}$$

Equação 1

onde: k = constante de Boltzmann: $1,3806503 \cdot 10^{-23}$ J/K; Rh = raio das vesículas; η = viscosidade da solução dispersante.

O diâmetro médio foi determinado em um analisador de ZetaSizer® ZS 90, Malvern Instruments – Nano, pertencente ao Laboratório de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química, Unicamp. As amostras foram adicionadas à cubeta contendo os eletrodos com capacidade para aproximadamente 1 mL. Os resultados foram analisados em termos de intensidade de luz espalhada. As medidas foram feitas a temperatura ambiente, em soluções diluídas das amostras (cerca de $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹) e realizadas em triplicata.

3.3.2.2. Medidas do potencial Zeta

Potencial zeta é um termo utilizado para designar o potencial eletrocinético de sistemas coloidais, que reflete o potencial de cargas na superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (Schaffazick et al., 2005).

De um modo geral, busca-se maximizar as forças repulsivas entre as partículas para obterem-se suspensões estáveis, uma vez que as forças de repulsão mútuas entre partículas adjacentes impedem a sua união. O modelo utilizado para explicar como atuam as forças elétricas na superfície das partículas é o Modelo da Camada Dupla (Florence & Attwood, 2003).

Pressupõe-se que se a partícula for negativa, ao redor dela coexistirão contraíons, íons de carga oposta, no caso, positiva. Inicialmente, ocorre uma atração eletrostática fazendo com que alguns íons positivos formem uma rígida camada ao redor da partícula, conhecida como camada de Stern. Todavia, outros contraíons são atraídos para a camada de Stern, gerando um equilíbrio dinâmico e dando origem a uma segunda camada chamada de difusa. Um ponto particular é o potencial na junção entre as duas camadas (de Stern e difusa), conhecido como potencial zeta. A manipulação do potencial zeta permite controlar o comportamento das partículas, pois indica a interação entre o potencial de superfície e as forças de repulsão entre as partículas (Florence & Attwood, 2003).

O potencial zeta é determinado utilizando-se uma combinação do espalhamento de luz acoplado com microeletroforese e pode ser obtido em um equipamento de espalhamento dinâmico de luz, onde a variação na frequência da luz espalhada é proporcional à mobilidade eletroforética (Shaw, 1991).

Os fosfolípidios são os principais componentes presentes nas suspensões lipossomais que são capazes de influenciar o potencial zeta, e fornecem um potencial negativo à interface (Schaffazick et al., 2005).

O valor de potencial zeta, dado em mV, foi determinado em um analisador de ZetaSizer® ZS 90, Malvern Instruments – Nano, pertencente ao Laboratório de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química, Unicamp. As amostras foram adicionadas à cubeta contendo os eletrodos com capacidade para aproximadamente 1 mL. Medidas foram realizadas em triplicata, com amostras diluídas na faixa de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, utilizando água deionizada como meio de dispersão a 25°C. Os resultados foram expressos como médias dessas três determinações.

3.3.2.3. Determinação da porcentagem de encapsulação e coeficiente de partição da Benzocaína

Suspensões lipossomais (4 mM) convencionais e elásticas contendo o anestésico local benzocaína (2 mM, em água) foram submetidas a ultracentrifugação (120.000 x g) por duas horas, em temperatura de 4°C. A concentração de benzocaína no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria UV (285 nm).

A porcentagem do anestésico local (AL) não encapsulado em vesículas multilamelares (MLV) foi determinada de acordo com a com a equação 2:

$$\% \text{ BZC não encapsulada} = \frac{\text{Absorbância do sobrenadante} - \text{Absorbância MLV}}{\text{Absorbância inicial do AL}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

A porcentagem de encapsulação foi calculada subtraindo-se a porcentagem do AL não encapsulado do total de anestésico (100%) presente na solução inicial. Os resultados obtidos foram expressos também em termos do coeficiente de partição (P) do soluto (benzocaína) entre duas fases não miscíveis: membrana (m) e aquosa (a) (Equação 3)

$$P = \frac{nm/Vm}{na/Va}$$

Equação 3

Nesta equação, n é o número de moles de benzocaína e V é o volume das fases, calculado assumindo-se a densidade lipídica de 1g/mL (de Paula & Schreier, 1995). Como o número de moles do anestésico em membrana (nm) adicionado ao número de moles em água (na) corresponde ao número de moles total na solução inicial, pôde-se determinar o valor de P para a benzocaína entre lipossomas (convencionais e elásticos) e água.

3.3.2.4. Morfologia: Microscopia Eletrônica de Transmissão

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o microscópio eletrônico de transmissão Zeiss – LEO 906, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia/Unicamp.

Com a finalidade de preparar o material para a microscopia, o seguinte procedimento foi adotado: uma gota da formulação contendo os lipossomas convencionais e elásticos, contendo ou não benzocaína, foi adicionada à grade de ouro. Após 10 s, o excesso da amostra foi retirado com papel de filtro e, em seguida, uma gota de solução aquosa de uranila a 2% (p/p) foi adicionada sobre a mesma, no intuito de melhorar o contraste das imagens. Após 8 s, o líquido em excesso foi novamente retirado com papel de filtro e, na sequência, uma gota de água Milli-Q foi adicionada à grade, seguindo-se o mesmo procedimento para a retirada do excesso, após 5 s. A grade permaneceu em repouso, em temperatura ambiente, até a secagem das amostras. O preparo das amostras e a microscopia foram realizados no mesmo dia (Guterres et. al., 2010; Grillo, 2011).

3.3.3. Caracterização das formulações em gel

3.3.3.1. Determinação de metodologia analítica para quantificação da BZC nos géis lipossomal e não lipossomal

A metodologia para avaliação de teor de benzocaína nos géis lipossomais e não lipossomais foi baseada na monografia de gel de benzocaína descrita na Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia, 2010). Algumas pequenas modificações foram feitas para se obter um método indicativo de estabilidade, que possibilitasse a detecção de eventual

degradação do ativo, nas amostras analisadas. As condições cromatográficas estabelecidas foram:

Comprimento de onda: 285 nm.

Coluna: C18, Phenomenex Gemini (150 x 4,6 mm - 5 μ m)

Fluxo: 1,0 mL / minuto

Temperatura: 25 °C

Tempo de corrida: aproximadamente 10 minutos

Fase móvel: Acetonitrila: tampão citrato de sódio pH 3,0 (50:50 v:v)

A quantificação da benzocaína nas diferentes formulações foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography- HPLC). O método foi validado de acordo com o Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, de forma a atender às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Segundo esta resolução, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão, adequados à análise (Brasil, 2003).

Os parâmetros geralmente envolvidos na validação de metodologia analítica são: linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de quantificação e detecção.

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, obtidas em três dias consecutivos, totalizando nove curvas, apresentando cada uma 6 concentrações compreendidas entre 4 e 24 μ g/mL de BZC diluída em água.

Para avaliação da seletividade do método foi preparado um padrão de benzocaína 20 μ g/mL, uma amostra de gel BZC 10% LE com a mesma concentração do fármaco e uma amostra de placebo contendo a mesma massa de gel pesada no preparo da amostra descontando-se a massa do fármaco. As amostras foram injetadas individualmente e os cromatogramas foram avaliados a fim de verificar a presença de algum pico no placebo que pudesse interferir na quantificação do fármaco.

Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla da 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 (INMETRO, 2003).

A repetibilidade ou precisão foi avaliada a partir do cálculo de desvio padrão relativo, DPR (Equação 4):

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada. O valor máximo aceitável é definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, porém deve apresentar valores inferiores a 5% (INMETRO, 2003).

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A análise da exatidão do método em uma forma farmacêutica é feita adicionando uma quantidade conhecida de fármaco a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado). Ela é verificada através de 9 determinações do princípio ativo, contemplando-se o limite de variação do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), com 3 réplicas de cada (Brasil, 2003).

O cálculo da exatidão é efetuado a partir da concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a Equação 5:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

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 (Brasil, 2003).

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 (Brasil, 2003).

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 Equação 6 e 7, respectivamente.

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 3 \quad \text{Equação 6}$$

$$LQ = \frac{DP}{IC} \times 10 \quad \text{Equação 7}$$

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

3.3.3.2. Degradação de benzocaína e avaliação do método indicativo de estabilidade

Os estudos de degradação forçada, denominados por *stress testing* pelo “Guidance for Industry: Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products”, refletem a estabilidade do ativo frente a diferentes condições de estresse provocadas na molécula. Eles são efetuados com o objetivo de caracterizar a estabilidade inerente a determinado produto, determinar os possíveis produtos de degradação e validar a capacidade das metodologias analíticas para avaliar a estabilidade química do produto (ICH, 2003).

Um método indicativo de estabilidade é definido como um método analítico capaz de quantificar com precisão os ingredientes ativos sem a interferência de produtos de degradação, impurezas do processo, adjuvantes ou outras potenciais impurezas. Uma abordagem pró-ativa no desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida (HPLC) deve envolver a degradação forçada nos estágios iniciais de desenvolvimento (Alsante et al., 2006).

HPLC é uma ferramenta analítica eficaz na avaliação da estabilidade de produtos e permite separar, detectar e quantificar compostos relativos à degradação, que podem se formar durante o período de estocagem e manufatura, além de detectar e quantificar impurezas que podem surgir da rota de síntese do princípio ativo (Ngwa, 2010).

O gel de benzocaína 10% lipossomal recém preparado foi utilizado para avaliação da estabilidade da benzocaína frente à diferentes condições de estresse, sendo elas: hidrólise ácida, hidrólise alcalina e oxidação.

Foram utilizados como soluções degradantes HCl 0,1N, HCl 1N, NaOH 0,1N, NaOH 1N e H₂O₂ 3%. As amostras do gel de benzocaína lipossomal foram colocadas em contato com o agente degradante por 24 h e, em seguida, foram quantificadas pelo método utilizado para determinação de teor de benzocaína nas amostras (item 3.3.3.1)

Durante o estudo, procurou-se atingir uma faixa de degradação do ativo entre 10 a 30%, para isso a degradação em alguns casos foi avaliada em tempos menores que 24 horas, a fim de analisar as degradações primárias decorrentes do princípio ativo. Tal faixa foi adotada para evitar possível formação de compostos de degradação secundários, o que não é desejável e poderia acontecer caso fosse provocada uma degradação de maior extensão.

3.3.3.3. Ordem das reações de degradação da benzocaína

Cinética reacional é o estudo da velocidade na qual as reações ocorrem e o conhecimento da cinética das reações fornece informações que permitem compreender os mecanismos das transformações envolvidas e prever o grau da transformação ocorrida em um período de tempo (Auton, 2005). A ordem de uma reação é definida como o número de termos de concentração que determinam sua velocidade. Em uma reação de degradação de ordem zero, a velocidade da reação (exemplo: decomposição, liberação do fármaco) é independente da concentração dos reagentes e a velocidade é constante. Na reação de primeira ordem a velocidade é determinada por um termo de concentração e, na de segunda ordem, a velocidade de degradação depende, do produto de dois termos de concentração (Auton, 2005).

A ordem da reação é uma grandeza experimental determinada a partir da lei de velocidade das reações químicas. As leis de velocidade são obtidas experimentalmente, de modo geral, medindo-se as concentrações de amostras retiradas no decorrer da reação química. No presente trabalho, a ordem da reação de degradação da benzocaína em meio básico foi determinada pela variação das concentrações de BZC em função do tempo (Prista et al., 1993).

Uma vez determinada a ordem da reação de hidrólise do fármaco, a constante da velocidade de degradação (k) e o tempo de meia vida ($t_{50\%}$) foram calculados conforme as equações descritas abaixo

$$k = \frac{\ln C_0 - \ln C}{t} \quad \text{Equação 8}$$

$$t_{50\%} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Equação 9}$$

onde:

k = constante da velocidade de degradação

C_0 = concentração inicial do fármaco

C_t = concentração do fármaco a uma dada temperatura

t = tempo em minutos

3.3.4. Estudos de Estabilidade

Os testes de estabilidade fornecem informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem em condições de armazenamento especificadas. A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (Brasil, 2005).

O prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por um estudo de estabilidade de longa duração (Brasil, 2005). Esses estudos são de fundamental importância pela necessidade de se saber, como se comporta uma preparação farmacêutica e, além disso, estabelecer até quando ela é inócua para o paciente e pode realizar a função para qual foi destinada (Prista et al., 1993).

O estudo de estabilidade acelerada visa acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte. O estudo de estabilidade de longa duração avalia as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (Brasil, 2005).

No estudo acelerado, a frequência de testes são os tempos 0, 3 meses e 6 meses. No estudo de longa duração a frequência de testes é 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses.

Neste trabalho realizamos o estudo de estabilidade acelerada, que pôde ser concluído em 6 meses (Brasil, 2005). As amostras foram dos géis foram colocadas em uma câmara de estabilidade com temperatura e umidade controlada – 40°C e 75% UR.

As formulações em gel submetidas ao teste de estabilidade acelerada foram:

- ✓ BZC 10% ;
- ✓ BZC 10% LC;
- ✓ BZC 10% LE;
- ✓ BZC 20%
- ✓ Benzotop;

O estudo foi conduzido em amostras de um mesmo lote. Os parâmetros avaliados nos estudos foram: teor, pH e perda de peso.

3.3.4.1. Análise do pH

O método utilizado para a verificação do pH das amostras foi a determinação potenciométrica. Os valores de pH foram acompanhados durante todo estudo de estabilidade, nos tempos já descritos, através da determinação potenciométrica.

3.3.4.2. Determinação do teor de BZC nas formulações

A dosagem de BZC nos géis submetidos ao estudo de estabilidade foi realizada através do método de quantificação por HPLC, desenvolvido e validado conforme descrito anteriormente, no item 3.3.3.1.

3.3.4.3. Perda de peso

O teste de perda de peso permitiu avaliar a perda de água das formulações, ao longo do tempo de armazenamento. Segundo a RE nº 1 (Brasil, 2005) a porcentagem permitida de peso perdido é de, no máximo, 5% para estudos acelerados e de 10% para estudos de longa duração. Para realização deste teste foram pesadas 5 embalagens vazias e, em seguida, as mesmas embalagens foram pesadas com as amostras (cerca de 10 g). As amostras foram colocadas para avaliação da estabilidade e pesadas nos períodos subseqüentes (3 e 6 meses).

A porcentagem de perda de peso perdido foi calculada, conforme Equação 10 abaixo.

$$\frac{[(PMCI - PMCS) \times 3]}{PMCI} \times 100 = \text{peso perdido} \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

PMCI: peso médio do conteúdo inicial

PMCS: peso médio do conteúdo nos tempos subsequentes (3, 6 meses)

3: fator de correção para 75% UR (ICH, 2003)

3.3.5. Peroxidação lipídica – estimativa da oxidação fosfolipídica (estabilidade química)

Durante o processo de preparação ou durante a estocagem, os lipossomas estão sujeitos à degradação e alterações químicas. Até na ausência de agentes oxidantes específicos, as cadeias dos ácidos graxos dos fosfolipídios podem ser oxidadas. Isto ocorre em um mecanismo de propagação em cadeia, via formação de radicais livres. O passo inicial da peroxidação é a retirada de um átomo de hidrogênio da cadeia lipídica. Os lipídios mais susceptíveis à oxidação são aqueles que contêm duplas ligações, como a EPC. Na presença de oxigênio, o processo pode se desenvolver pela formação de aldeído, quebra da cadeia e formação de peróxido de hidrogênio (Torchilin & Weissig, 2003).

A reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) tem sido usada para detectar a peroxidação lipídica e baseia-se na detecção de um pigmento vermelho, formado na reação com malondialdeído produzido pela oxidação lipídica, e que pode ser detectado por espectrofotometria em 532 nm, ou por fluorescência (Asakawa & Matsushita, 1980).

Para a realização do teste, foi traçada uma curva de calibração, utilizando-se como padrão o tetraetoxipropano (TEP), em concentrações crescentes, que variaram de 1 a 12×10^{-5} M. Para o teste, alíquotas do gel lipossomal foram retiradas e acrescentadas dos seguintes reagentes:

- solução de cloreto férrico a 0,3% - reagente catalisador;
- solução de butil-hidroxi-tolueno (BHT) a 0,2% - antioxidante;
- tampão glicina (0,2 M, pH 3,6);

- ácido tiobarbitúrico (TBA a 0,5% - reativo cromogênico) em solução de butil-hidroxi-tolueno (BHT a 0,2%) e dodecilsulfato de sódio (SDS, 0,3%).

As amostras de gel foram incubadas em banho de água fervente por 15 min. e, em seguida, resfriadas em banho de gelo. Em seguida, houve a adição de ácido acético glacial e clorofórmio na proporção de 1:2 (v/v). As amostras foram centrifugadas (500xg, 4°C) por 20 min. e a determinação da absorbância do sobrenadante foi realizada em 532 nm para leitura posterior na curva padrão de TEP.

Foram avaliadas as amostras de gel com lipossomas convencional e elástico, recém preparadas e após 3 e 6 meses de armazenamento a 40°C.

3.3.6. Análise reológica

O termo reologia (do grego *rheo* = fluxo e *logos* = ciência) foi introduzido por Bingham e Crawford no século XIX e adotado formalmente em 1929, com o intuito de identificar a parte da físico-química que trata da deformação dos sistemas líquidos, sólidos e semi-sólidos. A reologia pode, então, ser definida como o estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria (Auton, 2005). Dentro da perspectiva reológica, os sólidos são classificados como completamente resistentes à deformação, os líquidos como menos resistentes, e os gases como completamente não resistentes. Na área farmacêutica o estudo dos aspectos reológicos tem grande importância para caracterizar as formulações líquidas e semi-sólidas (Ferreira, 2008)

A reologia engloba diferentes propriedades relacionadas à deformação da matéria. Como exemplo pode-se citar: i) a espalhabilidade, que é a propriedade de um semi-sólido de se espalhar, quando submetido a uma força sobre uma superfície sólida; ii) a elasticidade, fenômeno de deformação associado à fibras e a filmes poliméricos; iii) a fluidez e viscosidade, termos antagônicos que tratam da propriedade de resistência ao fluxo de sistemas líquidos e semi-sólidos (Netz & Ortega, 2002).

Segundo Darr (1979), a viscosidade é a medida da resistência para fluir, ou espessamento, tal que quanto maior for a viscosidade de um produto, maior será sua resistência para fluir. Embora todos os fluidos ofereçam resistência às forças que promovem o deslizamento de qualquer camada sobre as suas vizinhas, esta só se manifesta quando há movimento relativo. A resistência ao movimento de cada camada do fluido é atribuída à viscosidade (Massey, 2002).

Para que um corpo flua, deve-se aplicar sobre ele uma força, denominada na reologia de tensão de empuxo, ou tensão de cisalhamento (τ), que gerará um gradiente de velocidade, denominado gradiente de cisalhamento, velocidade de cisalhamento ou velocidade de deformação (D). Esta é dependente da resistência interna da substância, ou seja, de sua viscosidade (Ribeiro et al., 1999).

A viscosidade (η) é um dos mais importantes parâmetros na reologia, principalmente na aplicação industrial farmacêutica. A equação matemática que descreve a viscosidade foi formulada por Isaac Newton, como sendo:

$$\eta = \frac{\tau}{D} \quad \text{Equação 11}$$

onde:

τ = tensão de cisalhamento (Pas);

η = viscosidade (Pas.s)

D = taxa de deformação (s^{-1})

A correlação entre a tensão de cisalhamento (τ) e a taxa de deformação (D) define o comportamento reológico (ou de escoamento) de um determinado corpo, e isso é expresso em um gráfico, onde τ está na ordenada e D na abscissa.

Os materiais são divididos em duas categorias gerais, dependendo de suas características de fluxo: newtonianos e não-newtonianos. O fluxo newtoniano caracteriza-se por viscosidade constante, independentemente da velocidade de cisalhamento aplicada. O fluxo não-newtoniano caracteriza-se por uma mudança na viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento e se subdivide em fluxo plástico, pseudoplástico e dilatante (Allen Jr et. al, 2007).

Os fluxos não newtonianos são ainda diferenciados em tixotrópico e reopéxico. O tixotrópico se caracteriza por apresentar um comportamento onde a viscosidade diminui com o decorrer da taxa de deformação; já o fluxo reopéxico apresenta um aumento da viscosidade em função da taxa de deformação. O fluxo tixotrópico é usado em algumas formulações farmacêuticas com grande utilidade (Allen Jr et. al, 2007).

O gráfico de perfil ou comportamento reológico é composto de duas curvas, sendo uma delas a de aumento da taxa de deformação e a outra de decréscimo desse parâmetro. Quando encontramos distanciamento entre essas duas curvas, estamos diante de um fenômeno denominado histerese (Figura 13), que evidencia que o produto analisado, ao sofrer uma

determinada tensão, apresentou deformação na sua estrutura tridimensional, deformação esta que não foi recuperada quando a tensão deixou de ser aplicada (Lachman, 2001).

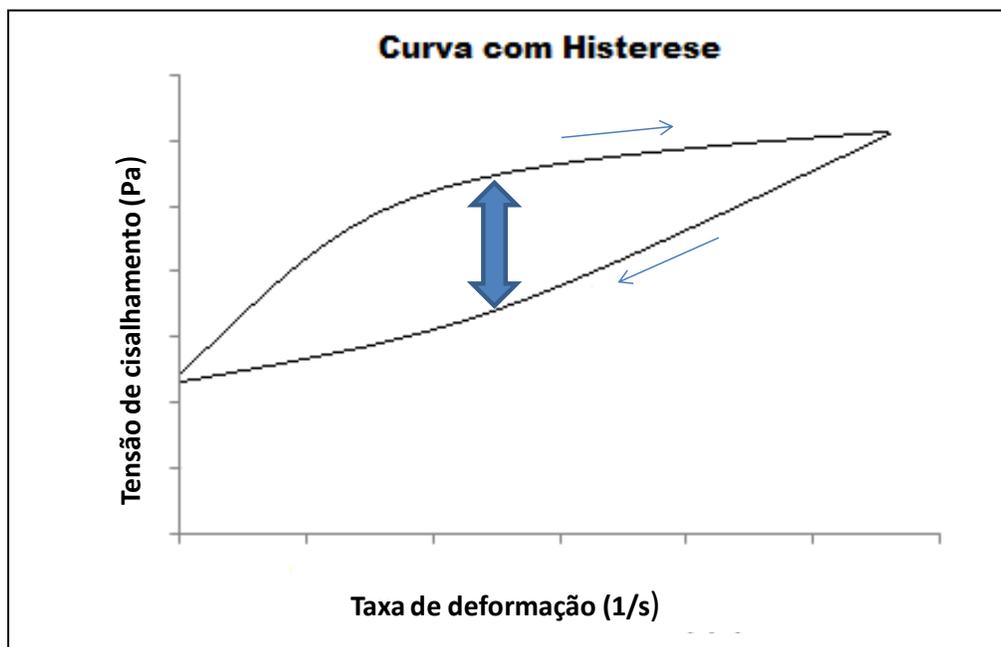


Figura 13. Representação de uma curva de perfil reológico, mostrando o distanciamento (seta azul) entre a curva ascendente e descendente denominado de histerese.

A análise reológica de um produto farmacêutico é realizada através do seu respectivo reograma, que caracteriza o tipo de fluxo apresentado pelo mesmo (Lachman, 2001). A reologia adquiriu, na última década, posição permanente nos testes de estabilidade de formulações farmacêuticas para uso tópico, uma vez que as características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico, interferindo na forma de utilização do produto, na adesão ao tratamento e, também, na aceitação do produto pelo consumidor. A caracterização reológica completa de um sistema pode ser útil desde o desenvolvimento do produto até a determinação do prazo de validade (Isaac et al., 2008).

Segundo Leonardi & Maia Campos (2001), cada categoria de produto deve apresentar, assim, um comportamento reológico adequado à aplicação respectiva, sendo conveniente conhecer as velocidades de deformação das operações a que vão estar sujeitas.

As análises de caracterização reológica das formulações foram realizadas no aparelho Haake RheoStress 1, no Instituto de Química/Unicamp, objetivando não só a caracterização dos sistemas em estudo como também o acompanhamento temporal e em temperaturas

diferentes, para posterior estimativa e análise da estabilidade dos mesmos. As formulações submetidas aos estudos de estabilidade acelerada foram analisadas no início e após 3 e 6 meses de armazenamento a 40°C graus.

Alíquotas de cada amostra foram colocadas no aparelho de forma com que toda superfície da placa fosse coberta, sendo o excesso da amostra removido cuidadosamente com espátula; em seguida iniciaram-se os testes, coletando-se os dados em computador acoplado ao mesmo, para posterior análise. O tempo de análise foi 300 segundos para curva ascendente e 300 segundos para curva descendente e o gradiente de cisalhamento foi de 0 [1/s] a 300 [1/s]).

Os parâmetros analisados foram: perfil reológico, área da histerese e viscosidade.

3.3.7. Avaliação in vitro da toxicidade das formulações de benzocaína em cultura de células

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados com células provenientes de culturas permanentes 3T3 (fibroblastos de camundongos Balb/c). As culturas foram mantidas em cultivo contínuo através de repiques periódicos em meio de cultura DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de esptreptomicina), em pH 7,2-7,4, 37°C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂. O plaqueamento foi feito com a inoculação de 2 x 10⁴ células viáveis em placas de 96 cavidades, que atingiram a semi-confluência após uma incubação de 48 horas.

A viabilidade celular foi determinada através do teste de redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) (Figura 14). O princípio do teste consiste na captação do MTT pelas células e redução a formazan (composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais, resultando em acúmulo desse composto em células viáveis. A solubilização das células possibilita a liberação do formazan, que pode ser facilmente detectado por espectrofotometria, em 570 nm (Denizot & Lang, 1986; Welder, 1992). Quanto maior a formação do formazan, maior a atividade mitocondrial e a viabilidade celular.

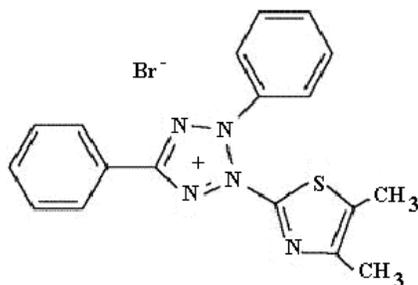


Figura 14. Estrutura química do MTT.

O tratamento das células foi dividido em géis placebos e géis contendo benzocaína. As concentrações de benzocaína testadas variaram de 0,38 a 7,56 mM. Para os testes com os géis placebo, foram consideradas concentrações correspondentes à massa de gel/mL equivalente às formulações contendo benzocaína. Para os géis de benzocaína a 20% foi realizada a diluição a fim de que a concentração de benzocaína fosse a mesma contida nas formulações de benzocaína a 10%.

As células foram encubadas por um período de 2 horas com:

- BZC 10%
- BZC 20%
- BZC 10% LC;
- BZC 10% LE;
- Benzotop;
- Gel placebo;
- Gel placebo de LC;
- Gel placebo de LE.

Em seguida, fez-se a substituição do meio de cultura e incubação 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 etanol (P.A.), a fim de dissolver os cristais de formazan produzidos pela redução do corante. As placas foram agitadas por cerca de 20 min para garantir a solubilização do formazan. A absorbância da solução em cada cavidade foi medida em 570 nm (espectrofotômetro BioTek ELx800).

Os resultados foram expressos em um gráfico de viabilidade celular vs concentração de benzocaína. O IC₅₀ (concentração de benzocaína que provoca a morte de 50% da população

celular no ensaio) foi obtido através da regressão não linear usando equação sigmoidal concentração/resposta (Origin 6.0 - Microcal™ Software, Inc., Northampton, MA, USA).

3.3.8. Ensaio de liberação e permeação de benzocaína das formulações em gel em células de difusão vertical do tipo Franz

O uso do teste de dissolução *in vitro* para determinar a liberação de fármacos de sólidos orais está descrito em Farmacopéias e é utilizado rotineiramente no controle de qualidade desses produtos, principalmente para determinação da uniformidade de lotes e equivalência farmacêutica (Siewert et al., 2003; United States Pharmacopeia, 2010,). Para formulações dermatológicas e transdérmicas, o termo “liberação *in vitro*” é preferido. O objetivo do teste não é necessariamente mimetizar o comportamento *in vivo*, e sim avaliar indicadores de desempenho da formulação (Siewert et al., 2003).

Uma grande quantidade de artigos, assim como *guidelines* do FDA, preconizam o uso de células de difusão como a célula de Franz, equipada com membrana sintética para determinar a liberação *in vitro* de formulações tópicas, como cremes, gels e loções, e também de sistemas transdérmicos (Shah et al., 1989; FDA, 1997; Shah et al., 1999).

Para os ensaios de liberação *in vitro* da benzocaína foi utilizada a célula de difusão vertical do tipo Franz (Disa, Milano, I), com uma área de permeação de 0,6 cm², membrana de acetato de celulose com poro de 30 nm (Zancheta, 2009). A Figura 15 mostra o esquema da célula de difusão vertical do tipo *Franz* utilizada no presente estudo.

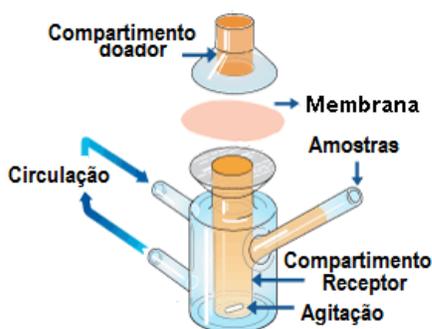


Figura 15. Representação esquemática da célula de difusão vertical (célula de Franz). Adaptado <http://www.permegear.com/franz.htm>. Acessado em 21 de janeiro de 2010

Para cada ensaio, o compartimento doador da célula foi preenchido com 1g de cada formulação de benzocaína enquanto o compartimento receptor foi preenchido com 4,2 mL de

NaCl (0,9%) contendo 8 mM de beta ciclodextrina, a qual aumenta a solubilidade da benzocaína cerca de 3 vezes (Pinto et al., 2005) garantindo condições Sink (menos de 20% da concentração de saturação) durante o experimento. O ensaio de liberação foi realizado durante um período de 8 h, à temperatura ambiente e sob agitação constante. Em intervalos pré-estabelecidos, foram retiradas alíquotas da solução receptora (300 µL), e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Ao compartimento receptor, foram adicionados volumes idênticos aos retirados os quais foram utilizados para o cálculo da diluição realizada. Os experimentos foram realizados em sextuplicatas.

O gráfico de quantidade de benzocaína acumulada no meio receptor em função do tempo forneceu o perfil de liberação. A inclinação da porção linear do gráfico representa o fluxo de penetração da benzocaína através da membrana e a sua intersecção com o eixo das abscissas permitiu determinar o valor do tempo de latência (*time lag*) do processo. Dessa forma, os dados obtidos a partir dos experimentos de liberação foram expressos em quantidades cumulativas de fármaco permeado em função do tempo, em um intervalo de 8 horas e analisados de acordo com a equação 12.

$$J = C_p \times C_d \quad \text{Equação 12}$$

onde **J** é o fluxo de fármaco através da membrana, **C_p** é o coeficiente de permeabilidade e **C_d** é a concentração de fármaco utilizado no compartimento doador.

Os experimentos com pele foram realizados da mesma maneira que os experimentos com membranas artificiais (acetato de celulose), com exceção da temperatura, a qual foi utilizada a 37°C, para simular a temperatura corporal, e o tempo de realização dos ensaios, que duraram 24 horas. Os parâmetros avaliados foram os mesmos avaliados com as membranas artificiais.

Foram utilizadas pele de orelha de porco, por apresentarem semelhança estrutural com a pele dos seres humanos (Godin & Touitou, 2007).

As orelhas foram compradas no Abatedouro Frigar Ltda-ME registrado no Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Estado de São Paulo (SISP) sob o no. 1015. As orelhas foram lavadas com água destilada e os pelos visíveis foram removidos cuidadosamente com uma tesoura (Herkenne et al., 2006). Posteriormente, elas foram separadas em dimensões padronizadas (2 cm²) e imersas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) para lavagem secas em um filtro de papel e congeladas a -20°C até o uso.

A cinética de liberação e permeação das formulações foi avaliada por meio da aplicação de modelos matemáticos de linearização. As equações empregadas estão apresentadas na Tabela 4, e foram aplicadas considerando a quantidade do fármaco liberado até o último intervalo de tempo, ou até o ponto onde houve a formação de platô nas curvas de dissolução.

Tabela 4. Equações matemáticas aplicadas para o estudo cinético e comparativo dos perfis de liberação das formulações

Modelo/Ordem	Equação
Zero ordem	$QI = Q_0 - K_0t$
Higuchi	$f t = K_H t^{0,5}$

Onde QI é a quantidade de fármaco liberada no tempo t, Q_0 a quantidade inicial de fármaco em solução, K_0 a constante de liberação de ordem zero; $f t$ a quantidade de fármaco dissolvida no tempo t, K_H a constante de dissolução de Higuchi.

IV. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos testes de diâmetro médio dos lipossomas, potencial zeta e determinação da porcentagem de encapsulação a análise estatística foi realizada com o teste T de Student não-pareado. Os valores obtidos nos testes de pH, peroxidação lipídica, citotoxicidade, liberação e permeação foram comparados por análise de variância de uma via (One-way ANOVA) com teste posterior de Tukey-Kramer. O software utilizado foi GraphPad InStat versão 3.0 (Graph Pad Software Inc.). O nível de significância (α) adotado foi de 5%.

V. RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS:

5.1.1. Distribuição do diâmetro médio das vesículas lipossomais

A Tabela 5 mostra a distribuição média de tamanho dos lipossomas convencionais e elásticos, vazios e contendo BZC, utilizados para o preparo das formulações em gel lipossomal de BZC.

Tabela 5. Diâmetro médio medido por intensidade (D_m) e polidispersão dos lipossomas ($1,0 \cdot 10^{-3}$ M) contendo ou não BZC, utilizados para o preparo das formulações lipossomais de BZC.

Tipo de lipossoma	$D_m \pm DP$	Polidispersividade
LC	$68,93 \pm 0,45$	0,107
LC + BZC	$60,29 \pm 0,54$	0,162
LE	$74,08 \pm 0,49$	0,105
LE + BZC	$78,71 \pm 0,67$	0,171

Após a encapsulação da benzocaína, não houve alteração significativa no tamanho das vesículas ($p > 0,05$). Com relação à homogeneidade das partículas, medida pelo parâmetro de polidispersividade, foi possível observar uma ligeira diminuição desta (maiores valores de PDI), após a encapsulação da benzocaína; apesar disso os valores de polidispersividade mantiveram-se abaixo de 0,2, compatíveis com sistemas considerados homogêneos (Ruozi et al., 2005).

Índices de polidispersividade semelhantes com valores entre 0,12 e 0,18 foram descritos para vesículas elásticas compostas de sacarose-lauril-éster (L-595), octaoxietileno lauril éster (PEG 8-L) e sulfosuccinato preparados em diferentes proporções (Uchino et al., 2011). Valores menores que 0,2 também foram encontrados para lipossomas compostos de fosfatidilcolina, brometo de dimetildioctadecilamônio e colesterol (Ruozi et al., 2005) e fosfatidilcolina e colesterol (Mura et al., 2007).

5.1.2 Potencial Zeta

Partículas em suspensão apresentam acúmulo de carga superficial que origina um potencial elétrico (potencial zeta - ζ). A medida desta propriedade permite obter informações sobre a estabilidade do sistema e de como as propriedades superficiais são modificadas nos processos e formulações. A Figura 16 apresenta os valores do potencial zeta dos lipossomas convencionais e lipossomas elásticos de 100 nm recém-preparados, suspensos em água, antes e após incorporação da benzocaína.

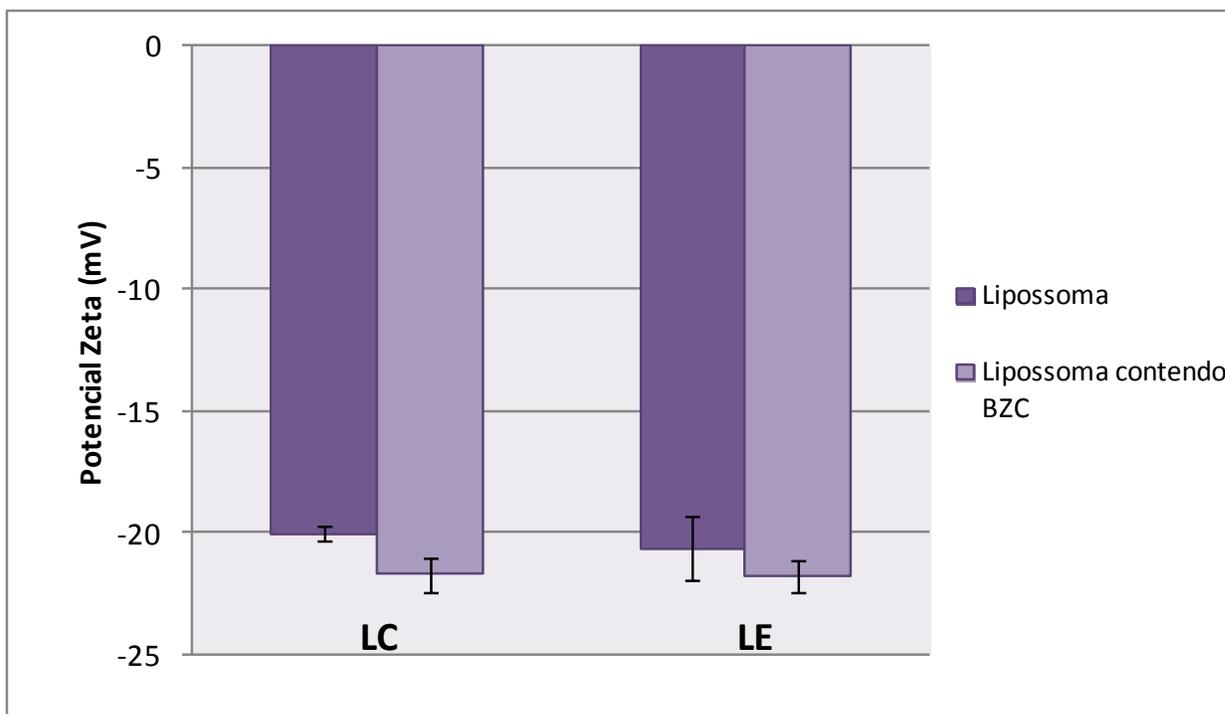


Figura 16. Potencial zeta dos lipossomas avaliados no presente trabalho: lipossomas convencionais de 100 nm, e lipossomas elásticos EPC:PEG-8L 3:2 (v:v), todos dispersos em água em temperatura ambiente.

Todas as amostras apresentaram valor próximo a -20 mV indicando a estabilidade das partículas. Valores de potencial zeta diferentes de zero estão relacionados à maior estabilidade das partículas. Para nanopartículas poliméricas, por exemplo, um valor de 30 mV (em módulo) é indicativo de boa estabilidade (Mohanraj & Chen, 2006).

A análise estatística provou não haver diferença significativa no valor do potencial zeta dos lipossomas, antes e após a adição do fármaco ($p > 0,05$), demonstrando que a adição de benzocaína à suspensão lipossomal não alterou a carga superficial das partículas, não afetando sua estabilidade. Este resultado era esperado porque a BZC não se insere na região

da cabeça polar dos lipídios dos lipossomas de EPC (Pinto et al., 2000) de forma a poder alterar o potencial Zeta e também não tem carga líquida em pH > 4,0.

O valor de potencial zeta negativo é condizente com dados descritos na literatura para lipossomas elásticos preparados a partir de sacarose-lauril-éster (L-595), octaoxietileno lauril éster (PEG 8-L) e sulfosuccinato (Uchino et al., 2011) e também para lipossomas convencionais de fosfatidilcolina (Ruozi et al., 2005; Mura et al., 2007).

5.1.3. Determinação da porcentagem de encapsulação e coeficiente de partição

A porcentagem do anestésico local benzocaína encapsulado em vesículas multilamelares convencionais (LC) e elásticas (LE) contendo 4 mM de EPC é dada na tabela 6. A partir dos resultados de porcentagem de encapsulação obtidos pôde-se calcular o coeficiente de partição da benzocaína entre esses lipossomas e a água, conforme descrito em métodos (item 3.3.2.3)

Tabela 6. Valores de porcentagem de encapsulação e do coeficiente de partição (P) da benzocaína em vesículas lipossomais convencionais e elásticas. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, para um n de 3 experimentos em dias distintos.

Tipo de lipossoma	Porcentagem de encapsulação	Coeficiente de partição (P)
LC + BZC	63,2 \pm 1,8	706,4 \pm 53,5
LE + BZC	67,2 \pm 1,6*	850,9 \pm 63,7*

* $p < 0,05$. Teste t não pareado.

Estes resultados mostraram que a porcentagem de encapsulação e o coeficiente de partição foram estatisticamente maiores ($p = 0,0386$ e $p = 0,0397$, respectivamente) para o anestésico encapsulado nos lipossomas elásticos. A maior partição da BZC na bicamada dos lipossomas elásticos condiz com a maior fluidez dessas vesículas contendo surfatante PEG-8L (Van der Bergh et al., 1999b). Essa maior fluidez também pode ser demonstrada através de medidas de parâmetro de ordem realizadas por RPE com o marcador de spins 5- doxil-estearato. Essas medidas foram realizadas e os valores reportados foram: 0,618 para vesículas convencionais e 0,512 para vesículas elásticas, $p < 0,0001$ (Franz-Montan et al., 2011).

A opção por expressar a interação anestésico-lipossoma por meio do coeficiente de partição decorre do fato de que, para o cálculo deste clássico parâmetro de hidrofobicidade leva-se em consideração a concentração molar de lipídios nos lipossomas (o que não ocorre nos cálculo de % encapsulação). Assim, o valor de P é um parâmetro que independe da

concentração de lipídios usada no ensaio de separação de fases (Lee & Schreier, 1993) e que permite a comparação de resultados obtidos em diferentes condições experimentais, em diferentes trabalhos.

A benzocaína é um anestésico local bastante hidrofóbico e que apresenta maior partição em membrana e menor solubilidade aquosa que outros anestésicos locais de uso clínico como a lidocaína, prilocaína, mepivacaína, bupivacaína e ropivacaína, cujos coeficientes de partição, entre lipossomas de EPC:colesterol: α -tocoferol 4:3:0,07 mol% (semelhantes aos LC deste trabalho) são 114 ± 16 , 57 ± 6 , (Cereda et al, 2006), 93 ± 7 , 136 ± 23 (de Araujo et al., 2004) e $132 \pm 25,8$ (Araújo et al., 2008b) respectivamente, em pH 7,4.

Mura e colaboradores (2007) relataram um valor de 82,3% para encapsulação de benzocaína (1%) em lipossomas compostos de colesterol e fosfatidilcolina (1:1 p/p) quando o anestésico foi dissolvido na fase hidrofílica (incorporação passiva), corroborando com os resultados encontrados neste trabalho (Mura et al., 2007).

Altos valores de % de encapsulação da BZC também podem ser observados para outros sistemas de liberação sustentada, como a nanopartícula polimérica de poli(L-lactídeo), demonstrando alta interação do anestésico hidrofóbico com a matriz polimérica da nanopartícula e o seu interior oleoso, resultando em eficiência de encapsulação de 73% (de Melo et al., 2010).

Valores de encapsulação de 80,6% e 84,3% foram encontrados para benzocaína em nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) e em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) respectivamente (Puglia et al., 2011).

5.1.4. Morfologia: Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Figura 17 apresenta as estruturas dos lipossomas convencionais e elásticos preparados por extrusão em membranas de nanoporos de 100 nm de diâmetro. No lado esquerdo da figura observam-se os lipossomas convencionais (imagens a1 e a2) e convencionais contendo BZC (imagens b1 e b2); do lado direito da figura os lipossomas elásticos antes (imagens c1 e c2) e após incorporação do anestésico local (imagens d1 e d2).

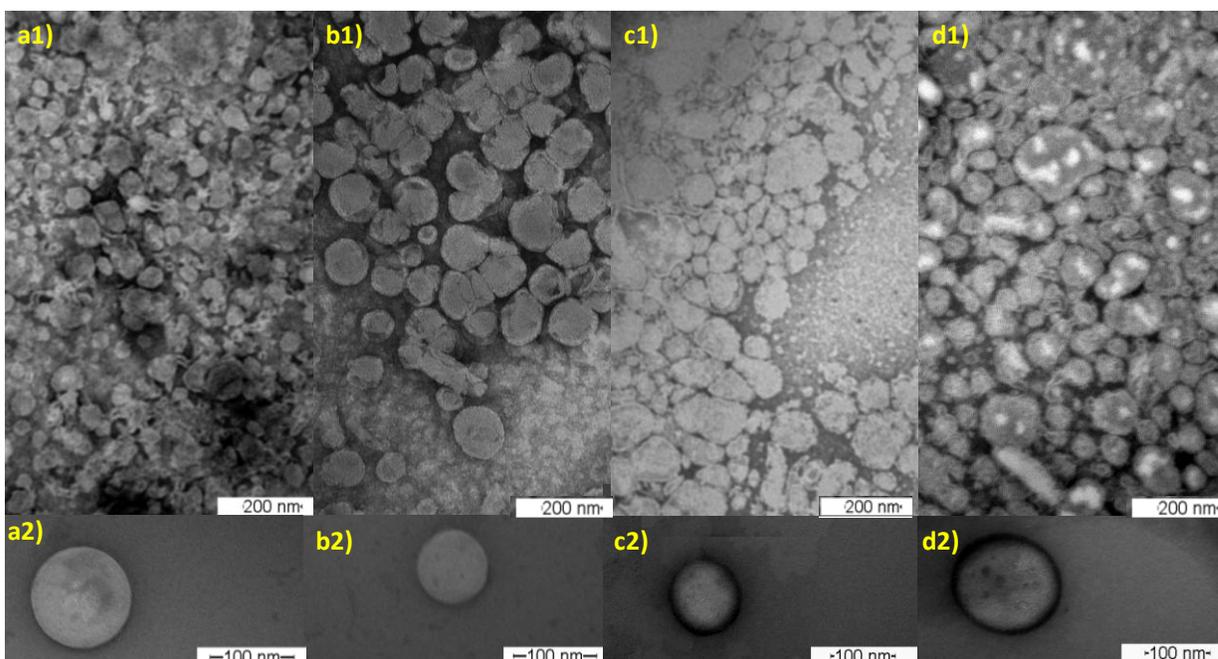


Figura 17. *Imagens obtidas em microscopia eletrônica de transmissão dos lipossomas: (a1) lipossomas convencionais (60.000 x), (a2) lipossoma convencional (100.000 x), (b1) lipossomas convencionais contendo BZC (60.000 x), (b2) lipossoma convencional contendo BZC (100.000 x), (c1) lipossomas elásticos vazios (60.000 x), (c2) lipossoma elástico vazio (100.000 x), (c1) lipossomas elástico contendo BZC (60.000 x), (b2) lipossoma elástico contendo BZC(100.000 x),*

Observa-se nas microscopias que os dois tipos de lipossomas possuem estrutura esférica, com superfícies bem delineadas e que correspondem à bicamada lipídica única.

Observando as estruturas dos lipossomas convencionais e elásticos pode-se concluir que a incorporação do PEG-8-L entre as moléculas de EPC para formar a bicamada lipídica dos lipossomas elásticos resultou em vesículas íntegras, estáveis e semelhantes, morfologicamente, aos lipossomas convencionais. A camada mais espessa, que pode ser visualizada nos lipossomas elásticos pode estar relacionada a maior hidratação desse lipossomas devido a presença de PEG-8L.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES EM GEL

5.2.1. Validação de metodologia analítica para quantificação da BZC encapsulada ou não em lipossomas e incorporada nos géis

A metodologia para quantificação de benzocaína 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 padrão de BZC, gel lipossomal e gel placebo (gel contendo todos os constituintes da formulação com exceção da benzocaína) conforme descrito no item 3.3., e em seguida, todas as amostras foram injetadas nas condições cromatográficas para avaliar a seletividade do método. A Figura 18 mostra os cromatogramas sobrepostos das amostras avaliadas. Através da observação desses cromatogramas foi possível concluir que nenhum pico referente ao placebo interfere na detecção da benzocaína sendo o método de detecção por HPLC proposto, seletivo e específico para o fármaco.

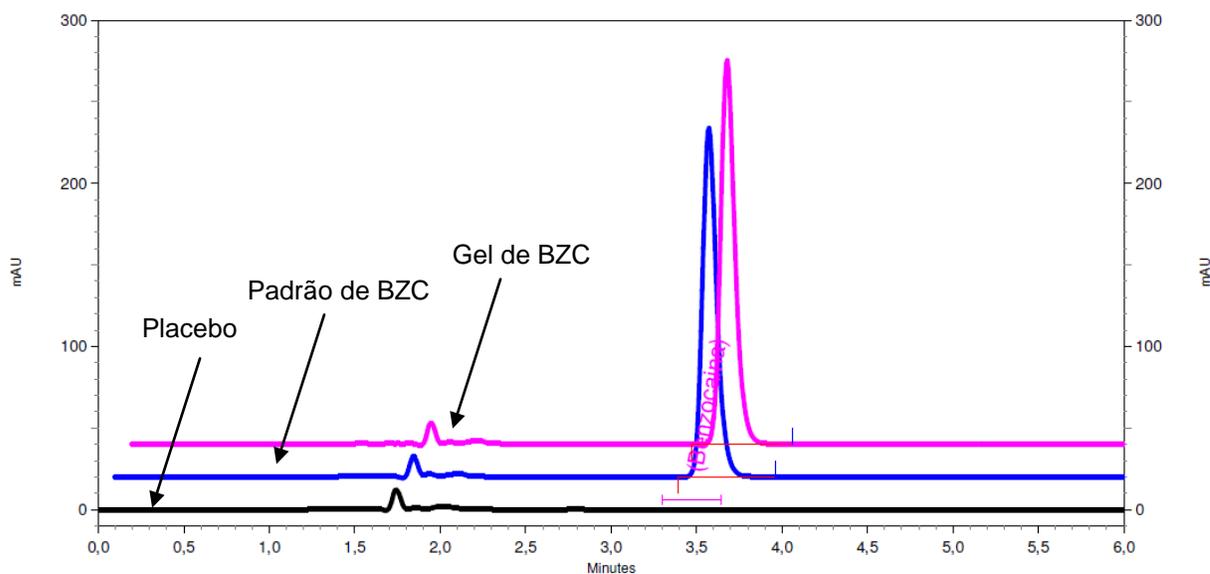


Figura 18. Cromatograma das amostras de placebo, padrão e gel de benzocaína, analisadas segundo as condições cromatográficas descritas.

A Figura 19a mostra em detalhes o pico cromatográfico característico da benzocaína pura (gráfico tridimensional: absorvâncias vs. tempo de retenção vs. comprimento de onda), que permitiu determinar a pureza de pico (Figura 19b) indicando a seletividade de método. Observando o gráfico em 3D, pode-se verificar o espectro da benzocaína em uma ampla faixa

de comprimentos de onda (220-400nm) e, embora outros picos que saem na corrida também possam ser visualizados, comprova-se a perfeita separação entre eles e o pico da benzocaína.

O teste de pureza de pico indica a pureza cromatográfica de um pico, comprovando que não existem outros compostos eluindo no mesmo tempo de retenção do composto de interesse ou causando interferência na análise. O valor ideal para esse parâmetro é 1,0 (Gilliard et al., 1993) e, como pode ser visto na Figura 19b, a pureza calculada para o pico de benzocaína foi de 1,0, comprovando, mais uma vez a seletividade do método.

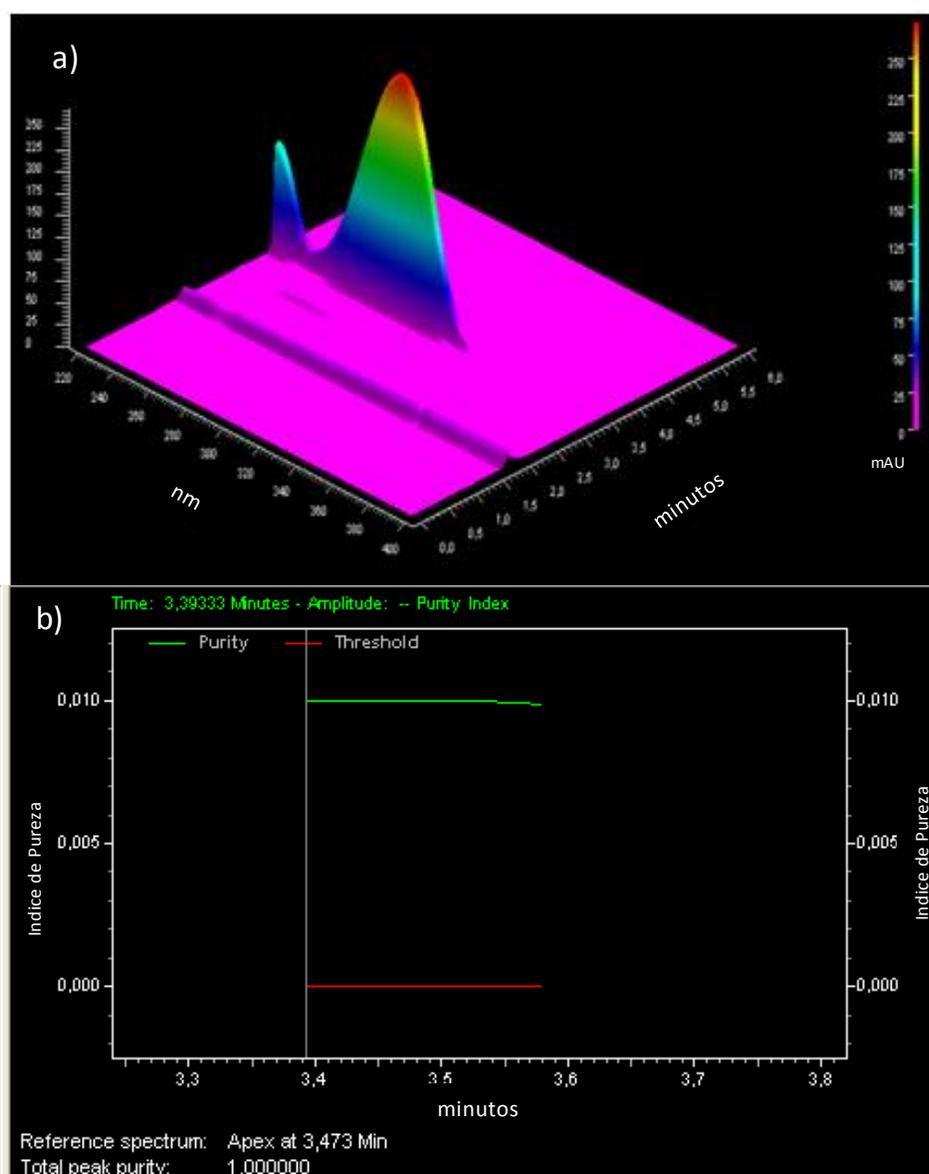


Figura 19. a) Cromatograma tridimensional (absorbância vs. tempo de retenção vs. Comprimento de onda) de uma solução de benzocaína pura. b) Gráfico de determinação de pureza de pico de benzocaína

A concentração de trabalho determinada para o método foi de 20 µg/mL, conforme descrito na Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia, 2010). As concentrações da curva de linearidade foram calculadas com base na concentração de trabalho e as amostras preparadas na faixa de concentração de 4 µg/mL a 24 µg/mL, que correspondem, a porcentagem de 20% a 120% da concentração de trabalho.

No gráfico de área *versus* concentração do analito após tratamento estatístico foi determinado um coeficiente de correlação de 0,9998 (Figura 20). Como o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (Brasil, 2003), o coeficiente de correlação calculado demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo especificado.

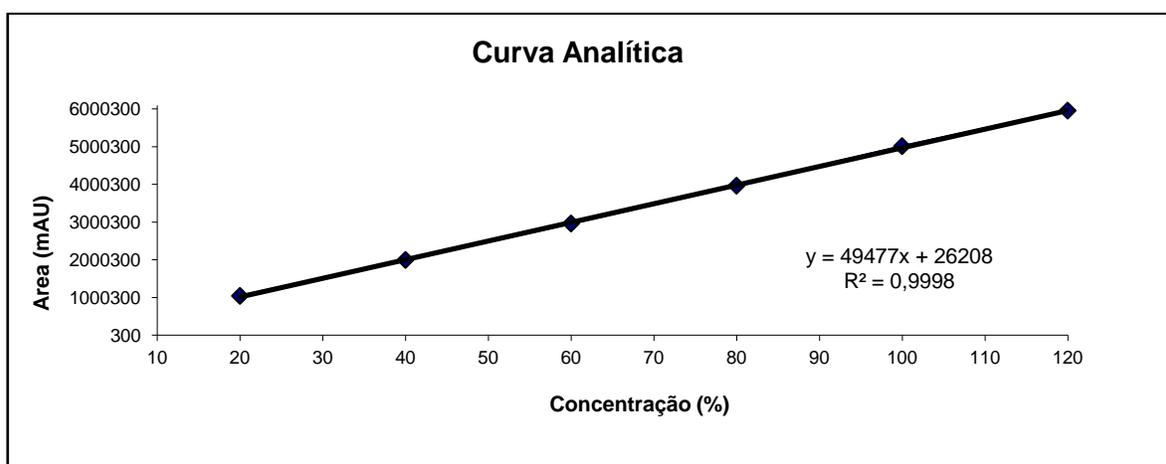


Figura 20. Curva de calibração de Benzocaína (Linearidade)

Para quantificação de benzocaína nas formulações, foram avaliadas as precisões por repetibilidade e precisão intermediária do método, conforme mostram as (Tabelas 7 a 9). Os resultados cumprem com o critério exigido pela legislação brasileira (Brasil, 2003), apresentando desvio padrão menor que 5%

Tabela 7. Resultados da precisão por repetibilidade para o método de quantificação da BZC.

Injeções	Réplicas											
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5		Amostra 6	
	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/MI	%	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%
1	19,99	99,97	20,03	100,15	20,20	101,02	20,28	101,41	19,81	99,04	20,11	100,55
2	20,11	100,55	20,32	101,61	20,27	101,34	20,15	100,76	19,92	99,59	19,96	99,82
3	19,81	99,03	19,99	99,94	20,18	100,88	20,21	101,06	19,87	99,33	20,07	100,34
MÉDIA	19,97	99,85	20,11	100,57	20,22	101,08	20,22	101,08	19,86	99,32	20,05	100,24
DP	0,15	0,77	0,18	0,91	0,05	0,23	0,07	0,33	0,05	0,27	0,07	0,37
DPR (%)	0,77	0,77	0,91	0,91	0,23	0,23	0,32	0,32	0,28	0,28	0,37	0,37
EXATIDÃO	*	99,85	*	100,57	*	101,08	*	101,08	*	99,32	*	100,24

Tabela 8. Resultados da precisão intermediária do método para quantificação da BZC – Dia 1- Equipamento 1

Dia 1- Equipamento 1												
Injeções	Réplicas											
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5		Amostra 6	
	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%
1	19,99	99,97	20,03	100,15	20,20	101,02	20,28	101,41	19,81	99,04	20,11	100,55
2	20,11	100,55	20,32	101,61	20,27	101,34	20,15	100,76	19,92	99,59	19,96	99,82
3	19,81	99,03	19,99	99,94	20,18	100,88	20,21	101,06	19,87	99,33	20,07	100,34
MÉDIA	19,97	99,85	20,11	100,57	20,22	101,08	20,22	101,08	19,86	99,32	20,05	100,24
DP	0,15	0,77	0,18	0,91	0,05	0,23	0,07	0,33	0,05	0,27	0,07	0,37
DPR (%)	0,77	0,77	0,91	0,91	0,23	0,23	0,32	0,32	0,28	0,28	0,37	0,37

Tabela 9. Resultados da precisão intermediária do método para quantificação da BZC – Dia 2- Equipamento 2

Dia 2- Equipamento 2												
Injeções	Réplicas											
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5		Amostra 6	
	µg/mL	%										
1	21,75	108,77	19,84	99,22	20,31	101,55	20,26	101,30	20,21	101,05	20,23	101,17
2	21,15	105,76	20,16	100,78	20,31	101,56	20,43	102,16	20,16	100,79	20,27	101,36
3	20,01	100,03	20,20	101,02	20,42	102,10	20,25	101,24	20,21	101,05	20,23	101,16
MÉDIA	20,97	104,85	20,07	100,34	20,35	101,74	20,31	101,57	20,19	100,96	20,25	101,23
DP	0,89	4,44	0,19	0,97	0,06	0,31	0,10	0,52	0,03	0,15	0,02	0,11
DPR (%)	4,23	4,23	0,97	0,97	0,31	0,31	0,51	0,51	0,15	0,15	0,11	0,11

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, a recuperação das amostras está entre a faixa de 99% a 101%, demonstrando a exatidão do método.

Tabela 10. Resultados de exatidão do método quantitativo de análise da BZC.

Réplicas	Concentrações					
	80%		100%		120%	
	µg/mL	%	µg/mL	%	µg/mL	%
1	16,01	80,05	20,24	101,22	23,90	119,51
2	15,85	79,25	20,09	100,47	24,03	120,14
3	15,91	79,53	20,16	100,79	23,97	119,97
MÉDIA	15,92	79,61	20,16	100,82	0,06	119,87
DP	0,08	0,41	0,08	0,38	0,27	0,32
DPR (%)	0,51	0,51	0,38	0,38		0,27
EXATIDÃO	*	99,51	*	100,82	*	100,40

As amostras preparadas no teste de teor também foram avaliadas com relação a sua estabilidade. Uma leitura inicial foi realizada, e após 24 h as mesmas amostras foram lidas. A recuperação calculada entre elas demonstra que as amostras são estáveis durante o período de até 24 horas (Tabela 11) após seu preparo, podendo ser utilizadas sem que haja alterações nos resultados.

Tabela 11. Resultados do teste de estabilidade de soluções contendo BZC.

Estabilidade de soluções				
	Padrão	Recuperação	Amostra 1	Amostra 2
Area Inicial (mAu)	5130297	5899620	5252897	5481619
Area após 24 horas (mAu)	5236367	6002808	5259692	5574420
Recuperação (%)	102,07	101,75	100,13	101,69

Os valores obtidos para o limite de detecção (Equação 6) e limite de quantificação (Equação 7) foram determinados a partir do intercepto e da inclinação da curva de calibração analítica. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores determinados para o limite de detecção e limite de quantificação de benzocaína.

Parâmetro	Valor ($\mu\text{g/mL}$)
Limite de detecção	1,193
Limite de quantificação	0,394

O limite de detecção determinado indica que este é o valor da menor concentração de BZC que pode ser detectada com alguma confiabilidade; já o limite de quantificação indica a concentração mais baixa de benzocaína que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitável pelo método de detecção por HPLC aqui apresentado.

5.2.2. Degradação de benzocaína

A benzocaína demonstrou ser instável frente a todas as condições de estresse em que ela foi exposta: hidrólise básica, hidrólise ácida e oxidação. A Figura 21 mostra a porcentagem de degradação do princípio ativo, após 24 horas de exposição aos agentes degradantes (NaOH 0,1N, HCl 0,1N, HCl 1N e H₂O₂ 3%). É possível notar que a via de degradação para a qual benzocaína se mostrou mais sensível foi a hidrólise básica. Nas outras condições de estresse a benzocaína também se mostrou sensível, porém em proporções menores.

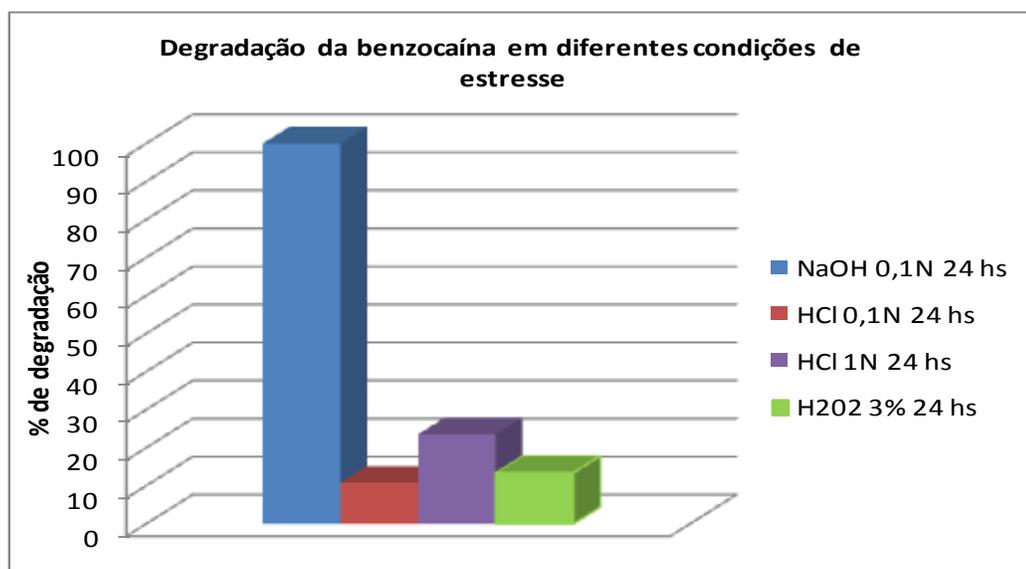


Figura 21. Degradação da benzocaína sob diferentes condições de estresse.

Devido a grande susceptibilidade da benzocaína à hidrólise básica, foram testados tempos menores de exposição ao NaOH 0,1N, a fim de evitar o aparecimento de degradações secundárias. O teste de degradação forçada visa a detecção, em condições extremas, da formação de eventuais produtos de degradações primários, oriundos da benzocaína. Alto grau de degradação não seria interessante nesta avaliação, já que os limites de degradação esperados em amostras em estabilidade devem ser baixos (Brasil, 2005).

Esses testes se justificam para posterior acompanhamento da BZC em estudo de estabilidade acelerado, em que a queda de teor do princípio ativo não deve exceder 5%, considerando-se a análise inicial do produto (Brasil, 2005).

O cromatograma da Figura 22a mostra o pico de benzocaína antes da exposição ao agente degradante, após 10 minutos de exposição ao hidróxido de sódio 0,1N (Figura 22b) e após 24 horas de exposição ao meio alcalino (Figura 22c). Foi possível observar ao longo do tempo, que o sinal de benzocaína praticamente desapareceu no cromatograma (ausência do pico) após 24 horas de exposição ao meio alcalino (Figura 22c), devido a sua degradação.

Em todos os casos onde ocorreu a degradação, foi possível detectar, no cromatograma uma queda de área do pico da benzocaína e a formação de picos menores, provavelmente oriundos da degradação do fármaco. A avaliação do cromatograma da amostra de gel de benzocaína em 3D, após 10 minutos de exposição ao NaOH 0,1N (Figura 23), mostra a nítida separação entre os picos oriundos da degradação do fármaco, demonstrando mais uma vez a capacidade do método analítico de detectar a queda de teor do fármaco e o aparecimento de produtos de degradação durante a estabilidade.

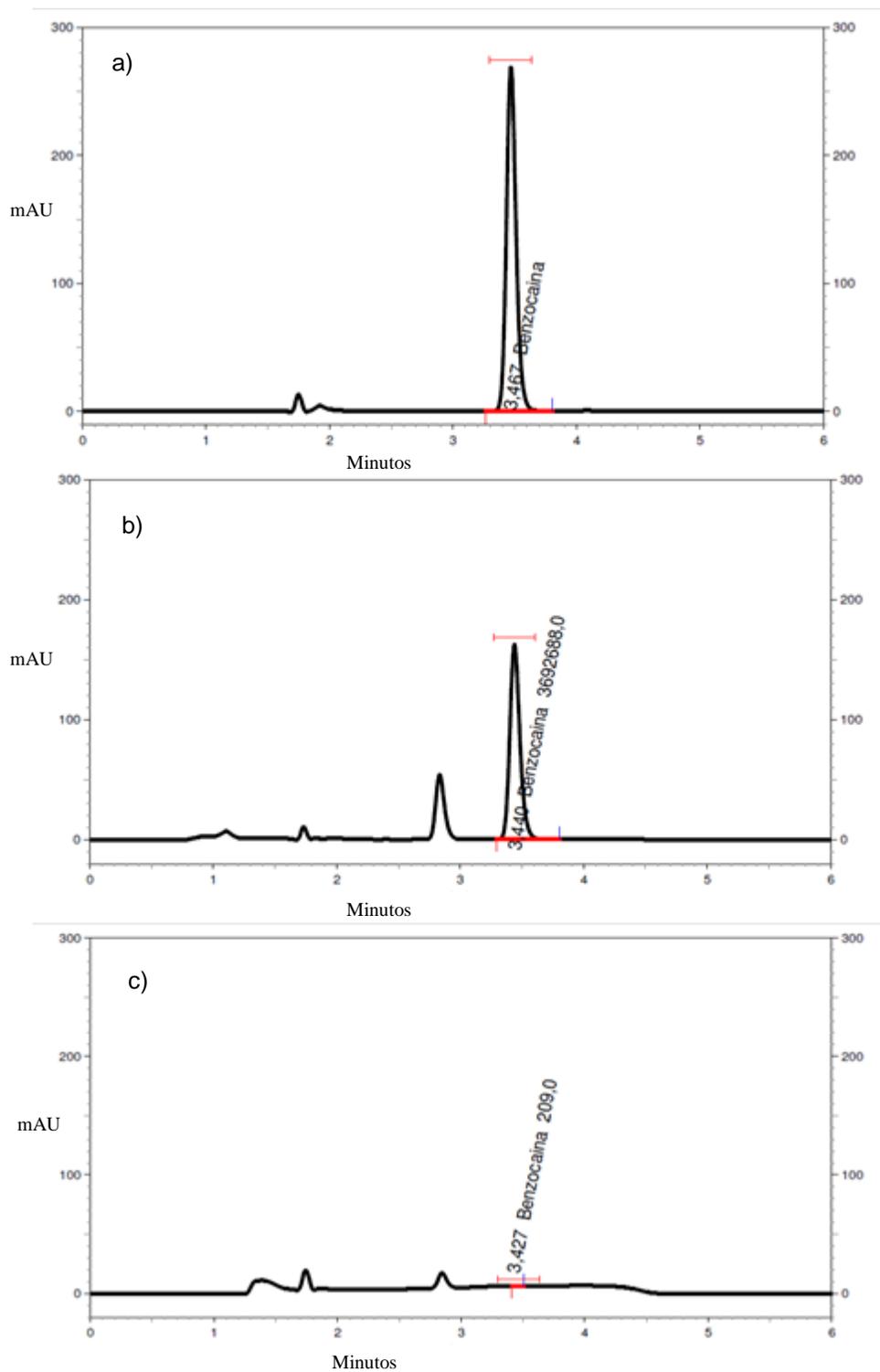


Figura 22. Cromatograma de amostra de gel de benzocaína – (a) amostra inicial sem exposição ao NaOH 0,1N, (b) benzocaína após 10 minutos de exposição ao hidróxido de sódio, (c) após 24 horas de exposição ao hidróxido de sódio.

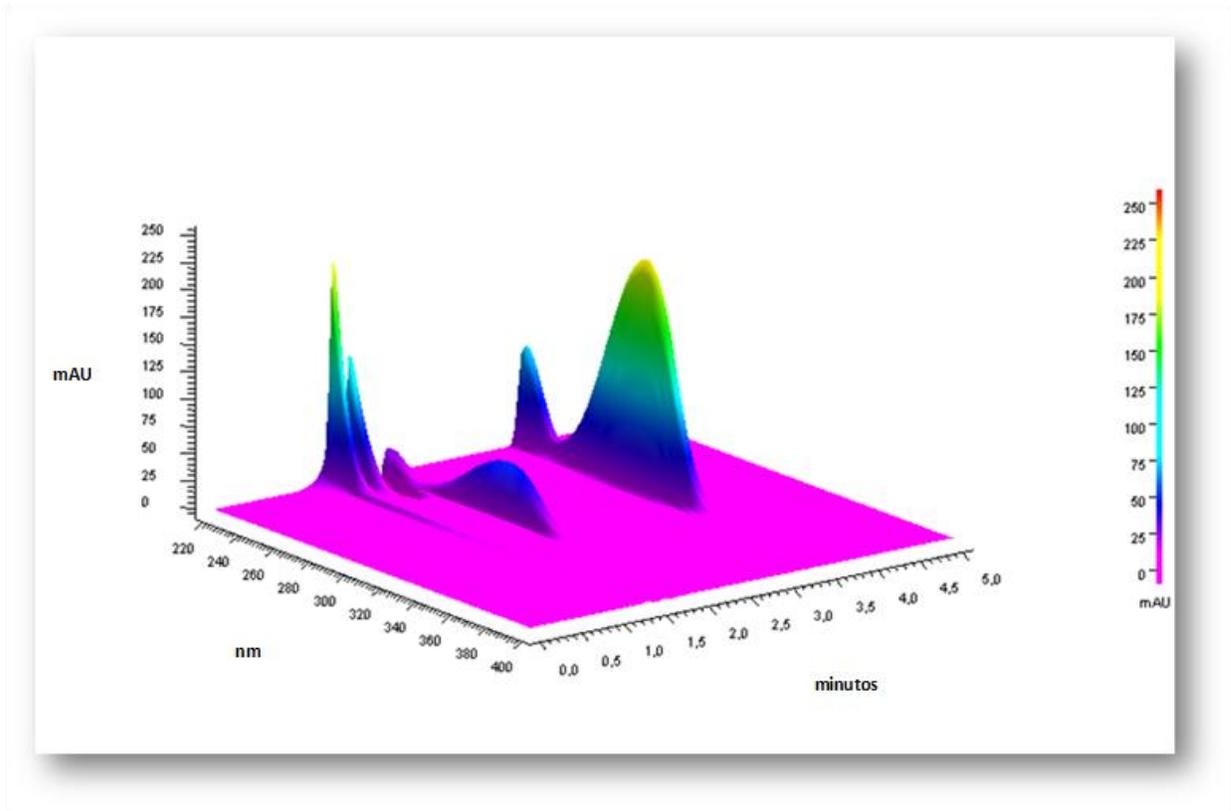


Figura 23. Cromatograma da amostra de gel de benzocaína em 3D, após 10 minutos de exposição ao NaOH 0,1N.

Um dos principais produtos da hidrólise da benzocaína, é o ácido p-aminobenzóico (PABA) representado na Figura 24 (Pérez-Lozano et al., 2005).

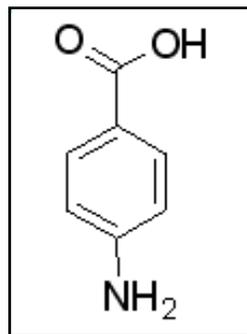


Figura 24. Fórmula estrutural do ácido p-aminobenzóico

Uma amostra padrão deste composto foi preparada e injetada nas mesmas condições em que as amostras de benzocaína degradadas foram avaliadas. Na Figura 25, é possível

observar a sobreposição dos cromatogramas de um padrão de PABA (linha verde) e de uma amostra de benzocaína após 120 minutos de exposição a hidrólise básica (linha azul). O principal pico de degradação formado possui o mesmo tempo de retenção que o padrão de PABA. Através dessa observação é possível concluir que o PABA é o principal metabólito formado nas amostras de gel de benzocaína expostas a hidrólise básica. Este resultado corrobora com aquele descrito por Pérez-Lozano e colaboradores (2005).

Na Figura 26 são apresentados cromatogramas de amostras de benzocaína, após 3, 10 e 30 minutos de exposição ao NaOH 0,1N. É possível visualizar o aumento na concentração de PABA, a medida que aumenta o tempo de exposição ao meio básico.

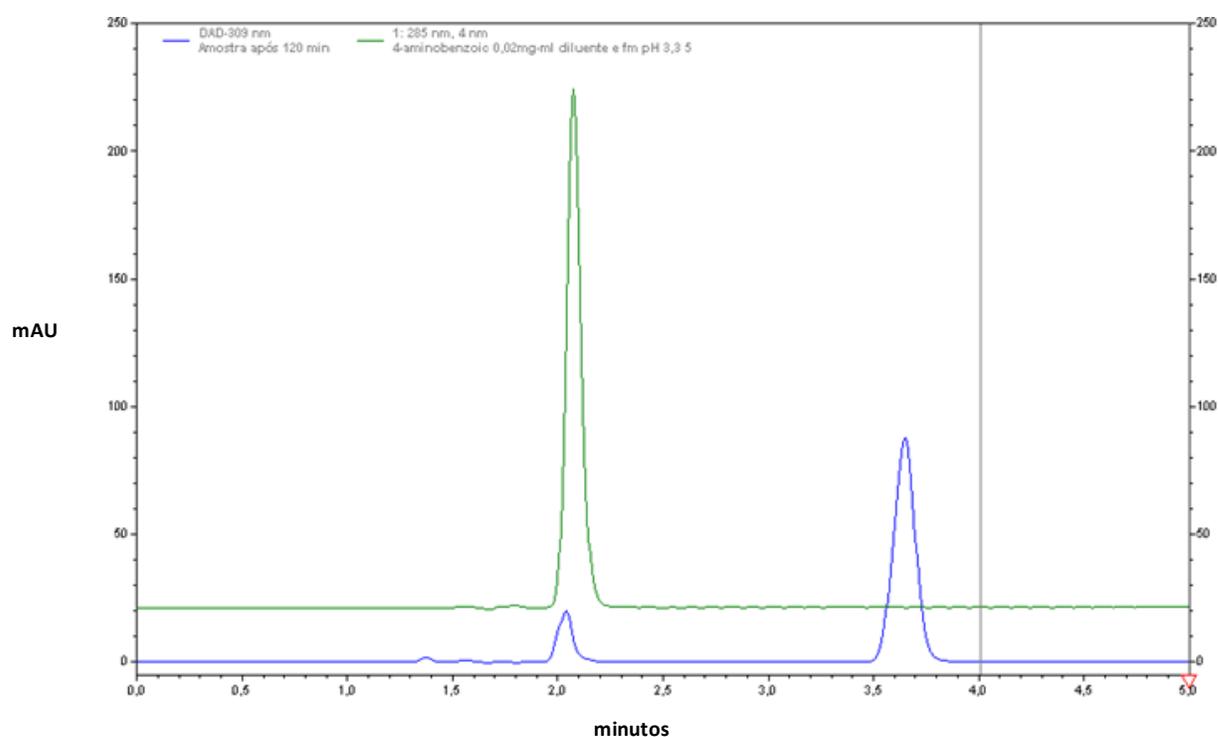


Figura 25. Sobreposição dos cromatogramas de um padrão de ácido *p*-aminobenzoico (linha verde) e de uma amostra de benzocaína (linha azul), após 120 minutos de exposição ao meio alcalino (NaOH 0,1N).

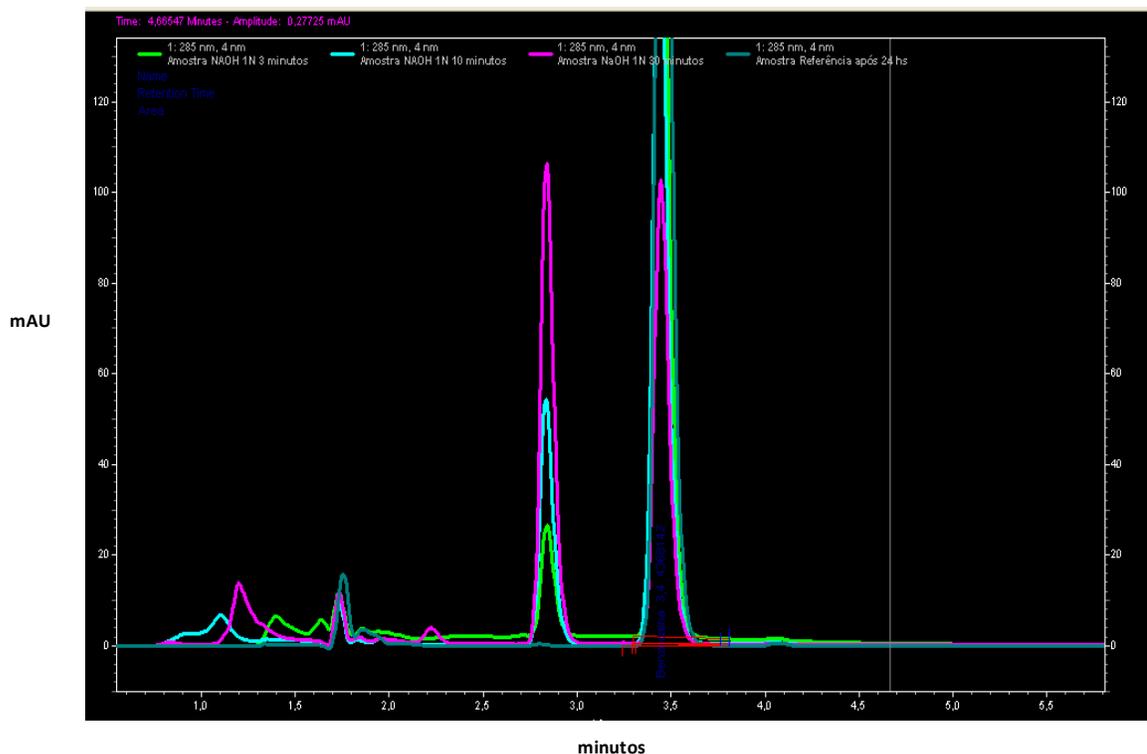


Figura 26. Cromatogramas de amostras de benzocaína após 3 minutos (linha verde), 10 minutos (linha azul claro) e 30 minutos (linha rosa) de exposição ao NaOH 0,1N.

Esses resultados são esperados pois, de fato, anestésicos locais do tipo éster são suscetíveis à hidrólise alcalina (Smith et. al, 2006).

5.2.3. Ordem das reações de degradação da benzocaína

A cinética de degradação de benzocaína frente à exposição ao NaOH 0,1N foi avaliada e o tempo de meia vida determinado.

Para determinação da ordem da reação de degradação os resultados foram plotados em três tipos de gráficos: concentração de BZC em função do tempo (adequado para identificar cinéticas de ordem zero – Figura 27a), $\log[BZC]$ em função do tempo (evidencia cinéticas de primeira ordem – Figura 27b), e $1/[BZC]$ em função de tempo (evidencia cinéticas de segunda ordem – Figura 27c). O coeficiente de correlação foi calculado para todos os casos e o maior valor encontrado foi o correspondente ao gráfico representativo da cinética de 1ª ordem, o que indica que a velocidade em que a reação ocorre depende da concentração de benzocaína, visto que a reagente NaOH 0,1N foi adicionado em excesso não interferindo na velocidade da reação. O tempo de meia vida (para que a concentração de benzocaína caia pela metade da

concentração inicial) calculado para a benzocaína foi de 2,3 horas, quando na presença de NaOH 0,1N.

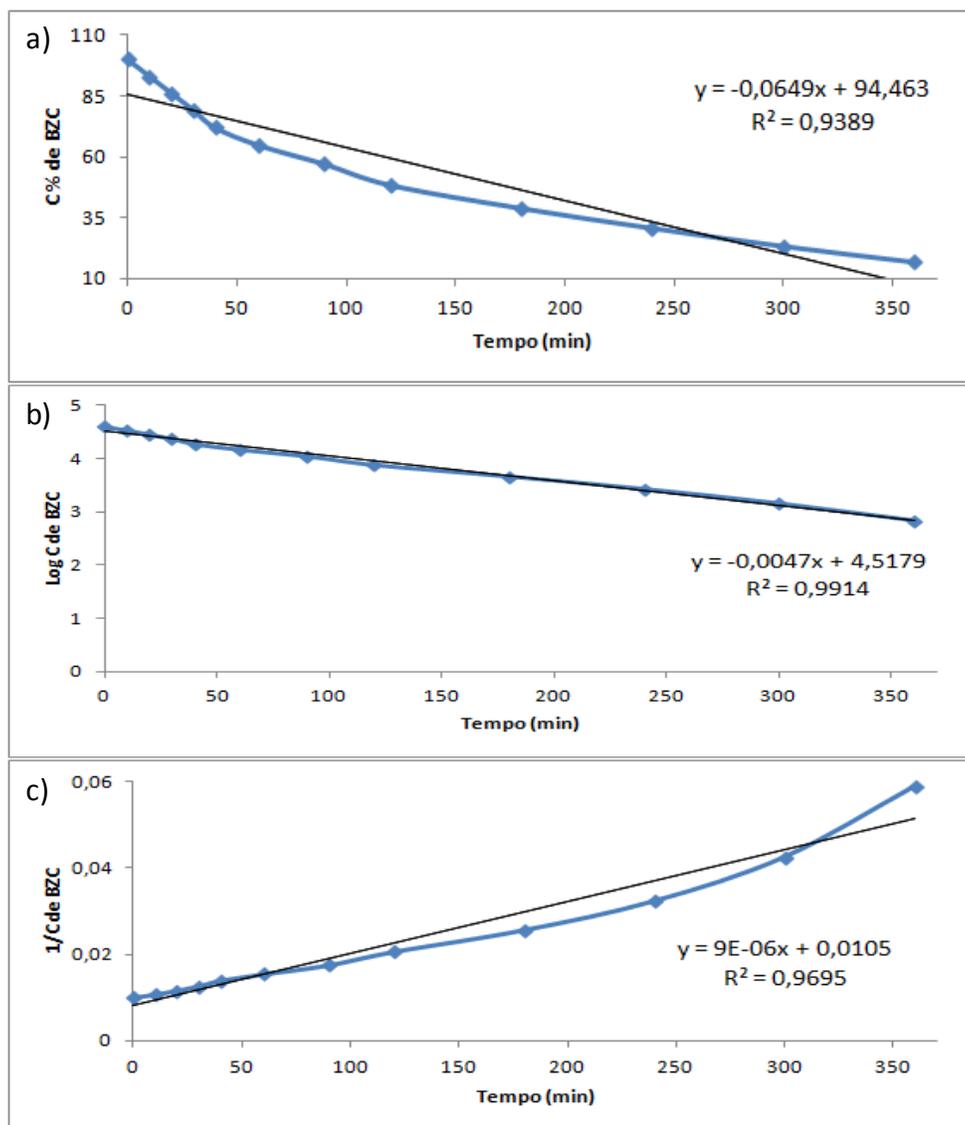


Figura 27. Ajuste dos dados de degradação da BZC em NaOH 0,1N para cinética de a) ordem zero; b) primeira ordem; c) segunda ordem

5.2.4. Estimativa da oxidação fosfolipídica (peroxidação lipídica) dos lipossomas presentes nos géis em estabilidade

A análise da peroxidação lipídica foi realizada a fim de verificar o nível de oxidação dos lipídios existentes nos lipossomas que compõem as formulações em gel, em função do tempo. Os géis foram avaliados antes de serem estocados e após 3 e 6 meses de exposição às condições de estabilidade acelerada (40°C e 75% de U.R.) (Figura 28).

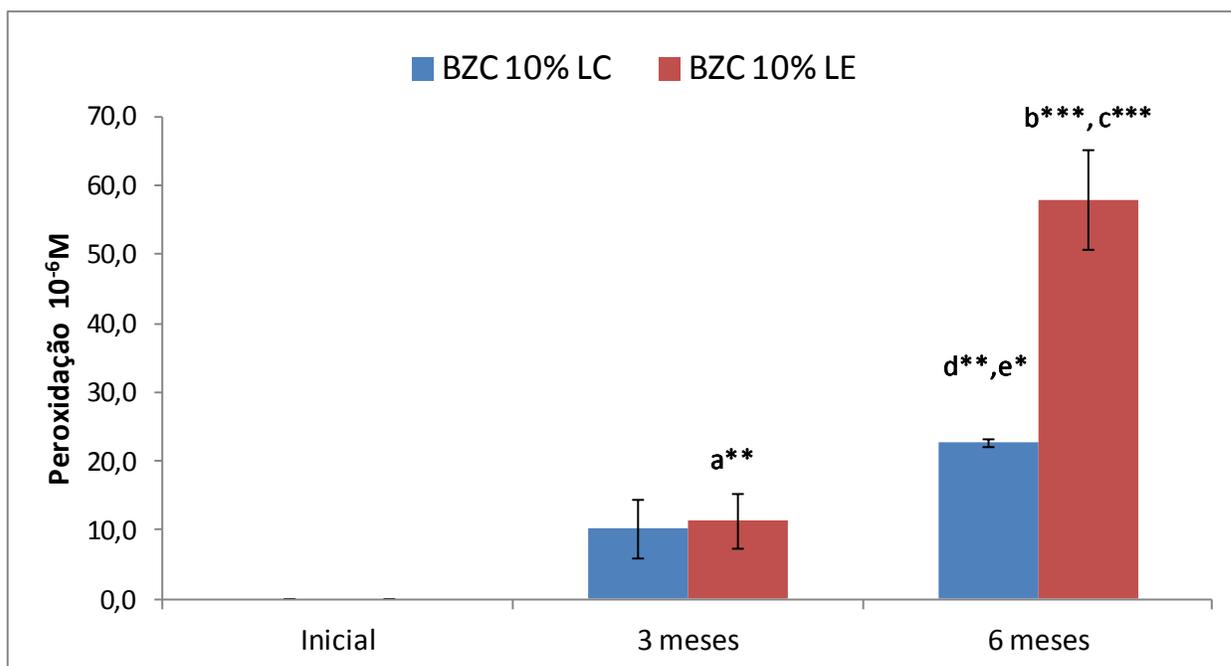


Figura 28. Teste de peroxidação lipídica pela medida de MDA ($10^{-6}M$) em formulações em gel de benzocaína lipossomal (lipossomas convencionais e elásticos): análise inicial, após 3 e 6 meses de armazenamento a 40°C e 75% de UR). Análise estatística: ANOVA/Tukey-Kramer, $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***).

a- BZC 10% LE Inicial vs 3 meses

d- BZC 10% LC Inicial vs 6 meses

b- BZC 10% LE Inicial vs 6 meses

e- BZC 10% LC 3 meses vs 6 meses

c- BZC 10% LE 3 meses vs 6 meses

Na Figura 28 é possível observar que, nos géis recém preparados, não foi detectada oxidação dos lipossomas. Após 3 meses de estabilidade dos géis, já é possível observar início de oxidação, em ambos tipos de lipossomas. Após 6 meses de estabilidade houve um aumento significativo da oxidação em ambas formulações, atingindo cerca de 30 μM nos géis contendo lipossomas convencionais e 60 μM nos géis contendo lipossomas elásticos. No entanto, a quantidade de endoperóxidos verificada após 6 meses de armazenamento sob estresse

(estabilidade acelerada) representa 0,53% nos lipossomas convencionais e 1% para os lipossomas elásticos da concentração total de lipídios passíveis de oxidação (5,65 mM no LC e 6 mM no LE considerando as diluições para preparação do gel).

Estes resultados de peroxidação são baixos visto que apenas 1% dos lipídios presentes na formulação sofreram peroxidação.

A estabilidade dessas suspensões lipossomais avaliadas anteriormente em nosso laboratório apresentaram um aumento significativo da peroxidação após 90 dias do preparo dos lipossomas mantidos em temperatura ambiente (Cereda et. al, 2008). A incorporação dos lipossomas nas formulações em gel parecem protegê-los da peroxidação.

Outro ponto importante a destacar é a maior peroxidação encontrada nas amostras de lipossomas elásticos quando comparada aos lipossomas convencionais após 6 meses de estabilidade ($p < 0,01$). Esta diferença pode ter sido causada pelo fato de não haver, na formulação, nenhum componente antioxidante, como no caso dos lipossomas convencionais, que possuem α -tocoferol em sua composição. Por outro lado, a maior oxidação observada nos LE pode decorrer da maior fluidez dessas vesículas (devido a presença do surfatante PEG-8L), permitindo acesso de água e oxigênio molecular às regiões mais hidrofóbicas da bicamada e, conseqüentemente, favorecendo sua maior oxidação em relação aos LC.

5.2.5. Estudo de estabilidade - Determinação de teor, pH e perda de peso dos géis de benzocaína lipossomais e não lipossomais.

As amostras de gel foram preparadas e analisadas para determinação de teor e pH. Em seguida, foram colocadas em armazenamento (condições de teste de estabilidade acelerada: 40°C e 75% U.R.) e os mesmos parâmetros foram analisados após 3 e 6 meses de estudo.

Os resultados de pH e teor estão apresentados na Figura 29 e Tabela 13 respectivamente.

Como pode ser visto na Figura 29 o pH de todas as formulações não sofreu alteração significativa ($p > 0,05$) ao longo do estudo.

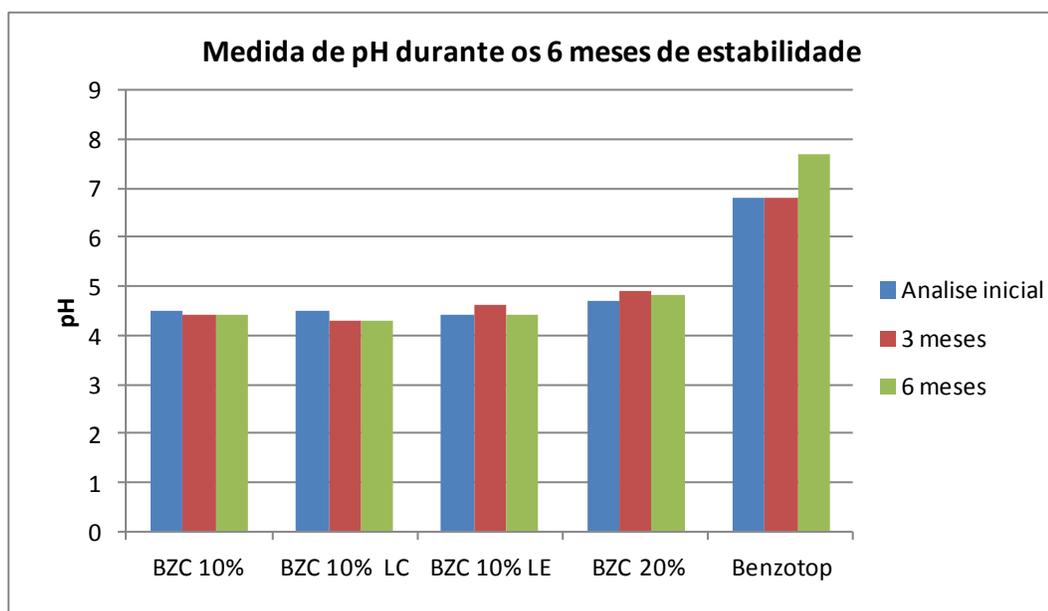


Figura 29. Média das medidas de pH das formulações em gel de benzocaína, durante 6 meses de estabilidade acelerada (40°C a 75% U.R.).

A diferença entre o pH da formulação comercial e as formulações teste são consequência dos diferentes excipientes que as compõem. As formulações teste são compostas por um polímero de ácido acrílico (Carbopol) que, na presença de água e soluções alcalinas, forma uma rede que dá viscosidade ao gel. Em geral as formulações preparadas com este polímero, possuem pH na faixa de 5-8,0 (Islam et al., 2004). Como todas as formulações foram preparadas utilizando-se o mesmo gel base, elas possuem pHs semelhantes. A adição de trielanolamina se deu até o ponto em que a formulação apresentou considerável viscosidade. As formulações preparadas em nosso laboratório apresentaram pH próximo a 5,0, o que não influencia na ionização do fármaco veiculado, já que a benzocaína se mantém na forma neutra em ampla faixa de pH. O produto comercial apresentou um pH um pouco mais alto já que sua formulação tem como principais componentes polietilenoglicol 4000 e polietilenoglicol 400, além de sacarina e outros agentes que auxiliam na correção do sabor (pois é usada como pré-anestésico em odontologia).

Apesar do pH permanecer estável durante o tempo de armazenamento, um grande aumento no teor do fármaco foi observado ao longo dos 6 meses de estabilidade. Esse aumento não era esperado, visto que os fármacos tendem a se degradar ao longo da estabilidade diminuindo o seu teor. No entanto, a possibilidade de desidratação dos géis, o que faria com que as amostras se concentrassem, foi colocada em questão e um teste de perda de peso foi realizado, a fim de confirmar essa suspeita.

Tabela 13. Resultados de teor de benzocaína nos géis em estudo de estabilidade acelerada (análise inicial, 3 meses e 6 meses) após armazenamento a 40°C e 75% de umidade.

	Análise Inicial		3 meses		6 meses	
	Teor (%)	DPR* (%)	Teor (%)	DPR (%)	Teor (%)	DPR (%)
Gel BZC 10%	102,54	0,44	227,52	0,25	243,85	1,03
Gel BZC 10% L.C.	102,39	0,76	123,55	0,95	154,50	0,33
Gel BZC 10% L.E.	101,18	0,49	127,23	2,27	144,99	0,25
Gel BZC 20%	101,23	0,24	130,69	2,73	141,25	0,27
Benzotop	95,54	0,26	102,27	2,67	100,09	0,35

*DPR- desvio padrão relativo

O teste de perda de peso foi realizado tanto para a embalagem em que os primeiros géis foram armazenados (vidro com tampa de plástico) (Figura 30) quanto para as novas embalagens testadas (bisnaga de alumínio) (Figura 31). Foram selecionados para realização do estudo, um gel não lipossomal (BZC 10%) e um gel lipossomal (BZC 10% LE).



Figura 30. Frasco de vidro com tampa de plástico, empregado inicialmente para armazenar as amostras preparadas para estudo de estabilidade.



Figura 31. Bisnaga de alumínio, adotada posteriormente para armazenamento das formulações em gel.

Nas Figuras 32 e 33 estão apresentados os dados referentes à perda de peso, para ambas as embalagens avaliadas nos géis de benzocaína não lipossomal (BZC 10%) e

lipossomal (BZC 10% LE). As amostras armazenadas na embalagem de vidro com tampa de plástico perderam 37% e 65% do seu peso, após 3 meses e 6 meses de estabilidade, respectivamente, confirmando a suspeita de perda de água. Já para as bisnagas, a perda de peso foi pequena (menos que 1% no final do estudo), o que pode ser explicado pelo fato do alumínio ser um material impermeável, além da bisnaga possuir um bom sistema de vedação, diferente das embalagens que foram inicialmente utilizadas. Apesar do vidro também ser um material impermeável, o conjunto frasco de vidro + tampa de plástico possui um sistema de vedação pouco eficiente, o que provocou a desidratação das formulações.

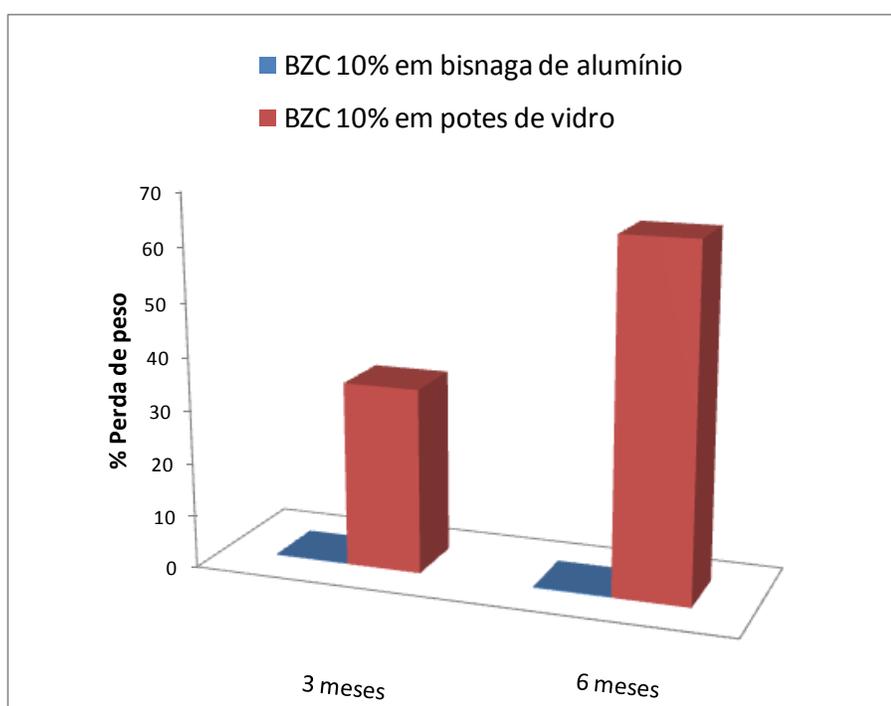


Figura 32. Avaliação de perda de peso das formulações de benzocaína 10% não lipossomal, após 3 e 6 meses de estabilidade

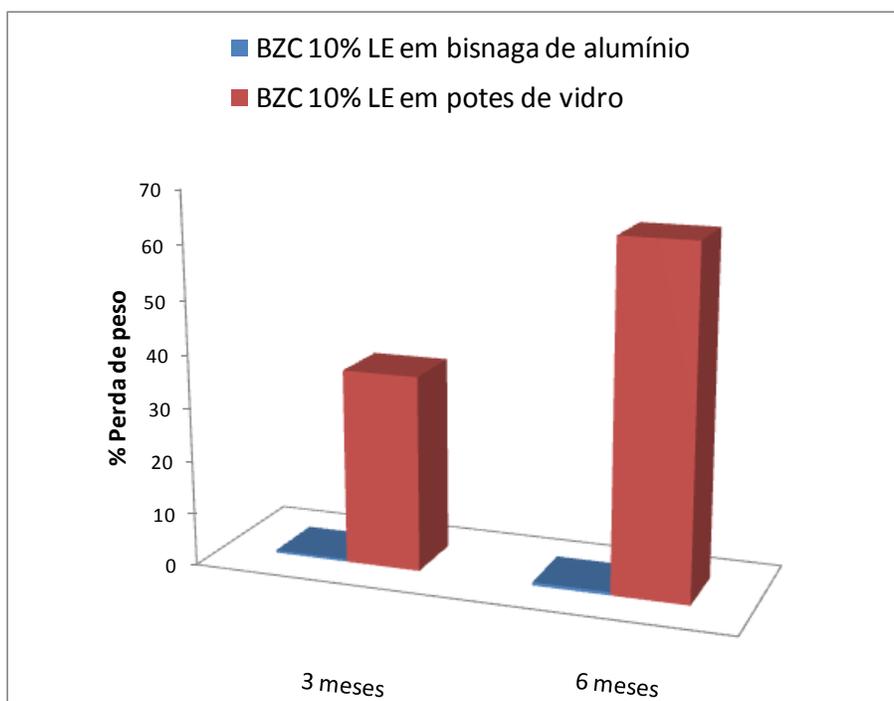


Figura 33. Avaliação de perda de peso das formulações de benzocaína 10% em lipossomas elásticos, após 3 e 6 meses de estabilidade.

A formulação comercial de benzocaína a 20% (Benzotop[®]) teve um pequeno aumento de teor durante o estudo, porém ainda permaneceu na faixa de 90% a 110%, dentro da especificação prevista pela Farmacopéia Americana (Tabela 13). O aumento de teor encontrado pode ser devido a uma pequena perda de água da formulação. No entanto, o poder de vedação da embalagem do produto comercial se mostrou mais efetiva que a primeira embalagem testada para as nossas formulações.

Novos géis foram então preparados e colocados em testes de estabilidade, utilizando uma nova embalagem que pudesse ser mais resistente à perda de água. Os resultados de teor para as amostras acondicionadas em nova embalagem estão apresentados na tabela abaixo:

Tabela 14. Resultados de teor de benzocaína nos géis submetidos aos ensaios de estabilidade acelerada (análise inicial, 3 meses e 6 meses após preparo).

	Análise Inicial		3 meses		6 meses	
	Teor (%)	DPR (%)	Teor (%)	DPR (%)	Teor (%)	DPR (%)
BZC 10%	98,18	0,17	101,73	0,86	100,12	0,74
BZC 10% LC	105,48	0,16	104,08	0,69	103,99	0,65
BZC 10% LE	100,28	0,04	100,19	0,56	100,11	0,32
BZC 20%	102,31	0,54	99,12	0,98	99,89	0,23

Segundo a RE nº1 de 2005, para fins de prazo de validade provisório de 24 meses, o relatório de estabilidade acelerado ou de longa duração de 12 meses deve apresentar variação de teor menor ou igual a 5,0% do valor de análise da liberação do lote, mantidas as demais especificações como pH e perda de peso (Brasil, 2005). Como pode ser visto, o teor de benzocaína nas formulações sofreu pequenas alterações, não tendo variado mais que 5% do seu valor inicial, estando dentro dos limites especificados pela legislação.

5.2.6. Análise reológica

Nos testes reológicos, os grupos de géis analisados foram: BZC 10%, BZC 10% LC, BZC 10% LE, BZC 20% e Benzotop[®].

Os géis recém preparados foram avaliados em duas temperaturas: 25°C (temperatura ambiente) e 32°C (temperatura da pele). Em seguida, as amostras foram colocadas sob armazenamento (condições para estabilidade acelerada: 40°C e 75% UR) e analisadas no tempo de 3 e 6 meses após o preparo, na temperatura de 25°C.

A Figura 34 apresenta o perfil reológico dos géis de benzocaína lipossomais, não lipossomais e do gel comercial nas diferentes temperaturas. Neles, a tensão de cisalhamento (τ) é medida em função da taxa de deformação (D).

A 25°C, a tensão de cisalhamento, é sempre menor nos géis preparados em nosso laboratório (entre 1000 e 2000 Pa) que no gel comercial (3000 Pa), demonstrando uma menor resistência dos nossos géis quando uma força é aplicada, propriedade que está diretamente relacionada aos componentes da formulação. Todos os nossos géis foram preparados a base de Carbopol, apresentando menor viscosidade que o gel comercial que tem como principal componente de sua formulação polietilenoglicol 4000 e 400 (Benzotop, 2010).

O gel BZC 10% LE tem menor tensão de cisalhamento inicial (900 Pa) (Figura 34c) que o gel BZC 10% LC (Figura 34b) e menor variação da inclinação das curvas em função da taxa de deformação, o que indica menor viscosidade, o que é compatível com a presença do surfatante PEG-8L.

Analisando o comportamento das curvas do perfil reológico dos géis de benzocaína em diferentes temperaturas (25°C e 32°C), nota-se que a curva reológica permaneceu praticamente inalterada com o aumento de temperatura, para as formulações preparadas em nosso laboratório. Já o produto comercial (Figura 34e) se mostrou mais sensível à alteração de temperatura, apresentando uma diferença marcante entre as duas curvas.

Outro parâmetro que pode ser obtido através dos gráficos do perfil reológico é a tixotropia, avaliada pela área de histerese dos géis, obtido pelo valor do distanciamento entre a curva ascendente e a curva descendente do perfil, ou seja, pela diferença entre as áreas sob as curvas ascendente e descendente do gráfico do perfil reológico das formulações.

Os valores de histerese das formulações preparadas em nosso laboratório e da formulação comercial podem ser vistos na Figura 34 e estão listados na Tabela 15.

Este parâmetro fornece informações acerca da capacidade e do tempo que a formulação demora a retornar à sua estrutura após ser retirada a tensão a que está sujeita. Uma formulação tixotrópica tende a ter maior *shelf-life* (“vida de prateleira”) pois, durante o armazenamento, os constituintes da formulação dificilmente se separam (Martin, 1993). Além dessa vantagem, a obtenção de formulações de uso tópico com carácter tixotrópico é bastante almejada, pois elas deformam-se durante a aplicação, ou seja, tornam-se mais fluidas, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento que se termina a aplicação, o que evita que o produto escorra (Gaspar & Campos, 2003). Por outro lado, é interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado, como ocorre no produto comercial, pois isso faz com que o produto escorra sobre a pele após aplicação devido a uma recuperação muito lenta da sua estrutura (Gaspar & Campos, 2003).

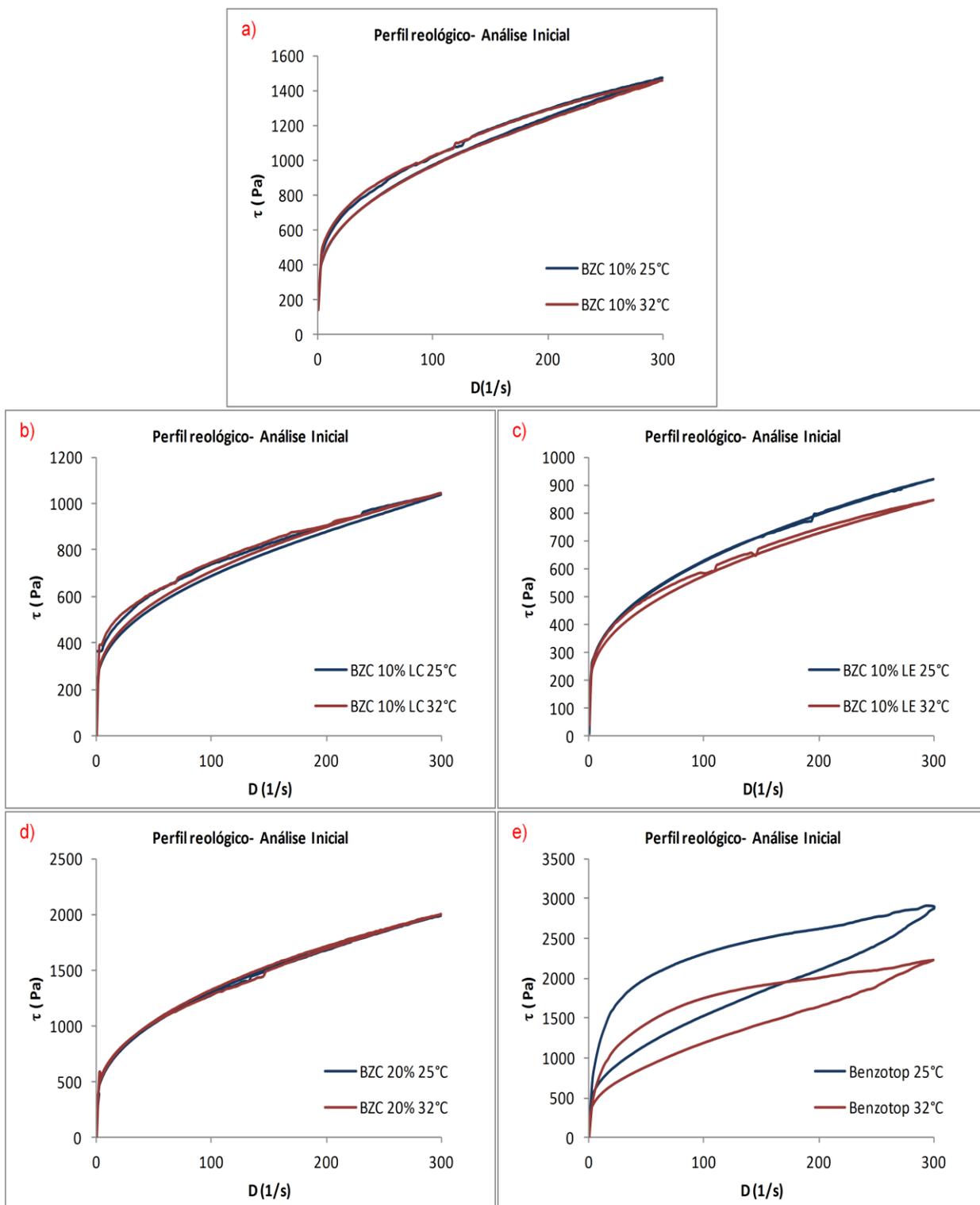


Figura 34. Perfil reológico dos diferentes géis de benzocaína, recém preparados, analisados nas temperaturas de 25°C e 32°C a) BZC 10%; b) BZC 10% LC; c) BZC 10% LE; d) BZC 20%; e) Benzotop®

Tabela 15. Cálculo comparativo da área da histerese dos géis, a 25°C (em Pas.s^{-1}) recém preparados

Formulação avaliada	Histerese absoluta (Pas.s^{-1})
BZC 10%	30575
BZC 10% LC	26034
BZC 10% LE	1166
BZC 20%	3778
Benzotop [®]	344935

A Figura 35 mostra a viscosidade (η) dos géis em diferentes temperaturas. As formulações preparadas em nosso laboratório não sofreram influência da temperatura na viscosidade dos géis, já a formulação comercial apresentou redução da viscosidade com o aumento da temperatura. Isso pode ser explicado pelo aumento da energia cinética das moléculas que faz com que ocorra fluidificação do sistema, i.e., menor viscosidade. Como as formulações teste e comercial possuem composição diferente, uma possível explicação para essa diferença na viscosidade entre elas é que o principal componente do produto Benzotop[®], o polietilenoglicol, sofre maior influência da temperatura, tornando-se menos viscoso. Já os géis de carbopol, são menos sensíveis à temperatura, mantendo inalterada sua estrutura em rede formada com a adição de trietanolamina.

A viscosidade inicial dos géis lipossomais se mostrou menor, quando comparada aos outros géis avaliados (não lipossomais e comercial). Uma provável explicação para essa diferença é que os géis lipossomais (BZC 10% LC e BZC 10% LE) foram preparados a partir de uma suspensão lipossomal, que se encontra no estado líquido-cristalino e compõe 50% da formulação final, conferindo uma menor viscosidade ao sistema. No entanto, a adição da suspensão lipossomal na formulação, não provocou alterações negativas relacionadas à histerese do produto, como mostrado anteriormente.

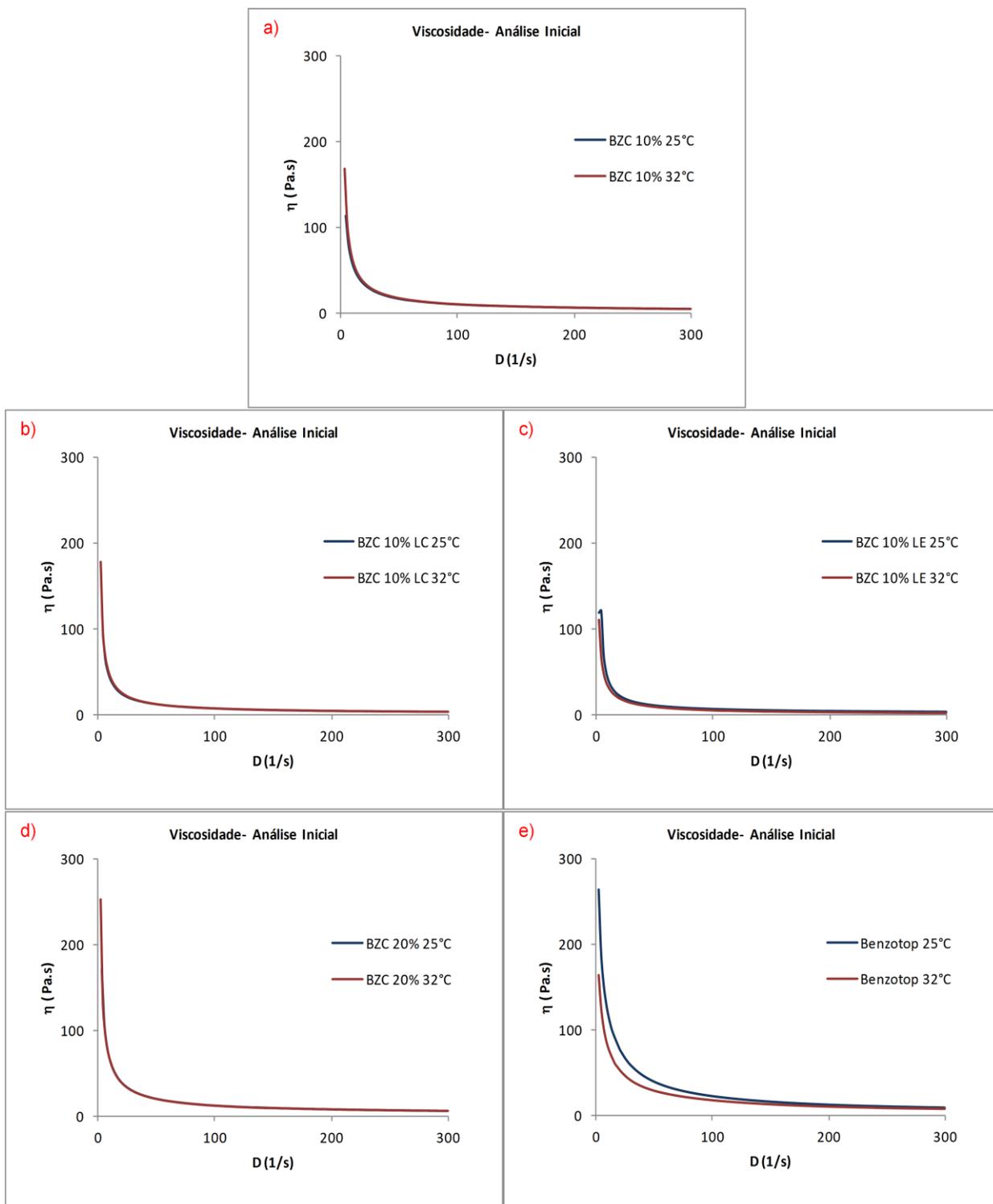


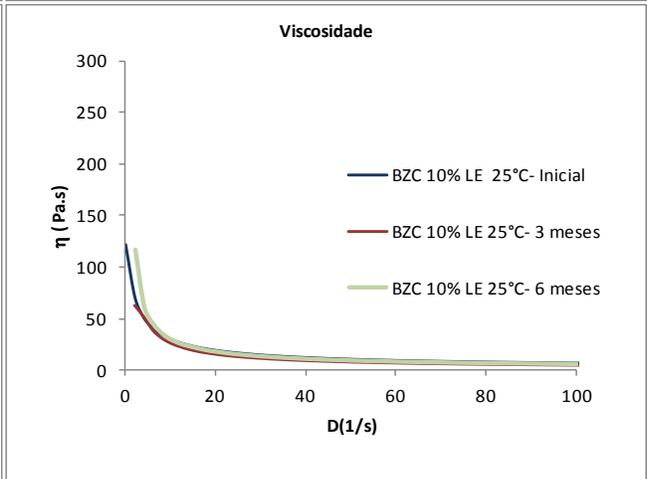
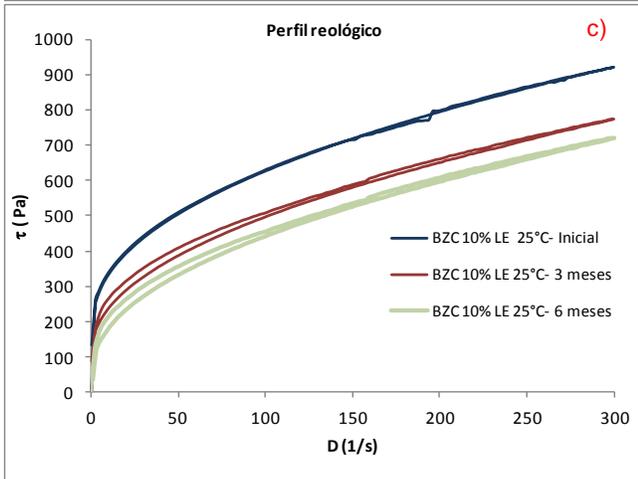
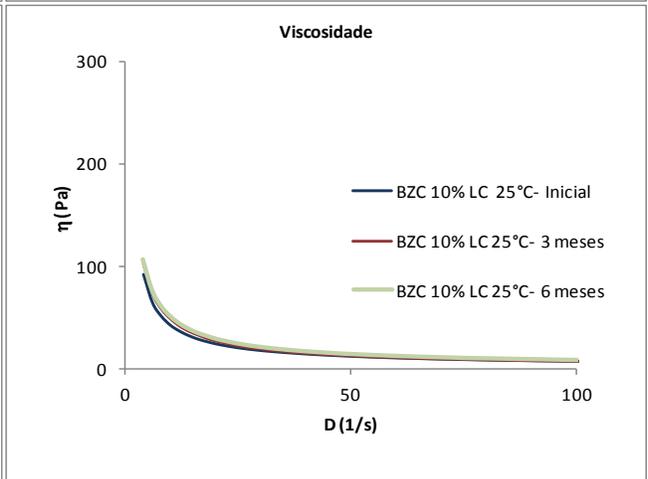
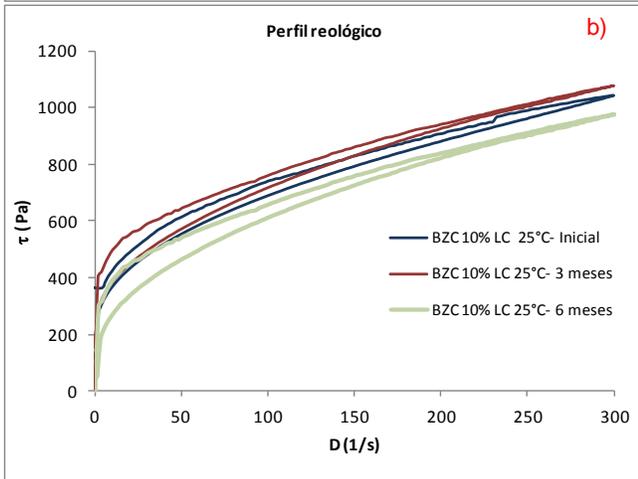
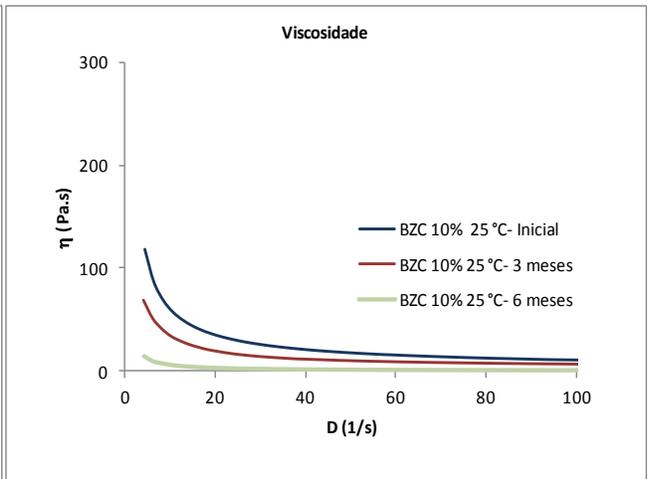
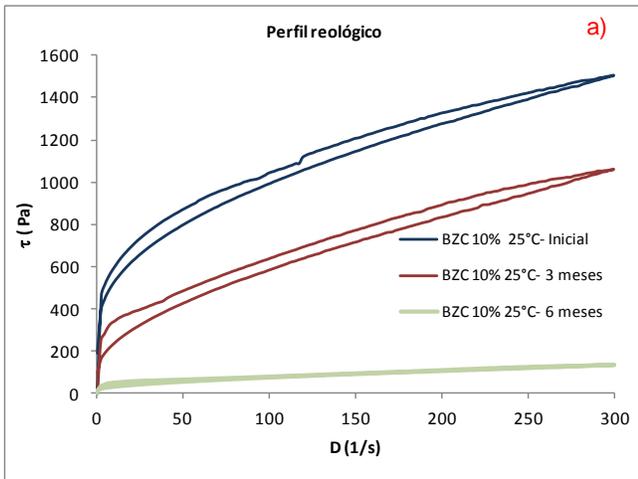
Figura 35. Viscosidade do geis de Benzocaína em diferentes temperaturas (25°C e 32°C).
a) BZC 10%; b) BZC 10% LC; c) BZC 10% LE; d) BZC 20%; e) Benzotop®

O gel BZC 10% LE foi o que apresentou menor viscosidade, como esperado, devido a presença do surfatante PEG-8-L na composição dos lipossomas, que faz com que estes possuam uma bicamada mais fluida, como discutido anteriormente.

A Figura 36 mostra a variação dos perfis reológicos (tensão de cisalhamento) e da viscosidade dos géis, após 3 e 6 meses de armazenamento (em condições de estabilidade acelerada), em comparação com sua análise inicial. Comparando o perfil reológico obtido com as amostras iniciais e após 3 e 6 meses de estabilidade, é possível notar que a formulação Benzotop[®] foi aquela que apresentou a maior queda na curva do perfil reológico, resultante da queda na viscosidade. As formulações de BZC 20% e BZC 10% também apresentaram diferenças em seus perfis reológicos, após 3 meses e 6 meses de estabilidade, no entanto, essa diferença foi mais discreta do que a observada com a formulação comercial. Após 6 meses de estabilidade, os géis lipossomais foram os que demonstraram perfil reológico mais estável, não apresentando grandes alterações nas suas curvas, quando comparados aos resultados anteriores.

De maneira geral esses testes demonstraram propriedades reológicas favoráveis para todos os géis à base de carbopol preparados em nosso laboratório. Essas propriedades se mantiveram constantes durante 6 meses de armazenamento, diferentemente do que se observou para o produto comercial disponível no mercado (Benzotop[®]).

Esses resultados estão de acordo com um estudo anterior também realizado em nosso laboratório, no qual foi demonstrado que é possível preparar formulações tópicas de grande estabilidade reológica com géis de carbopol lipossomais e não lipossomais (Silva, 2007)



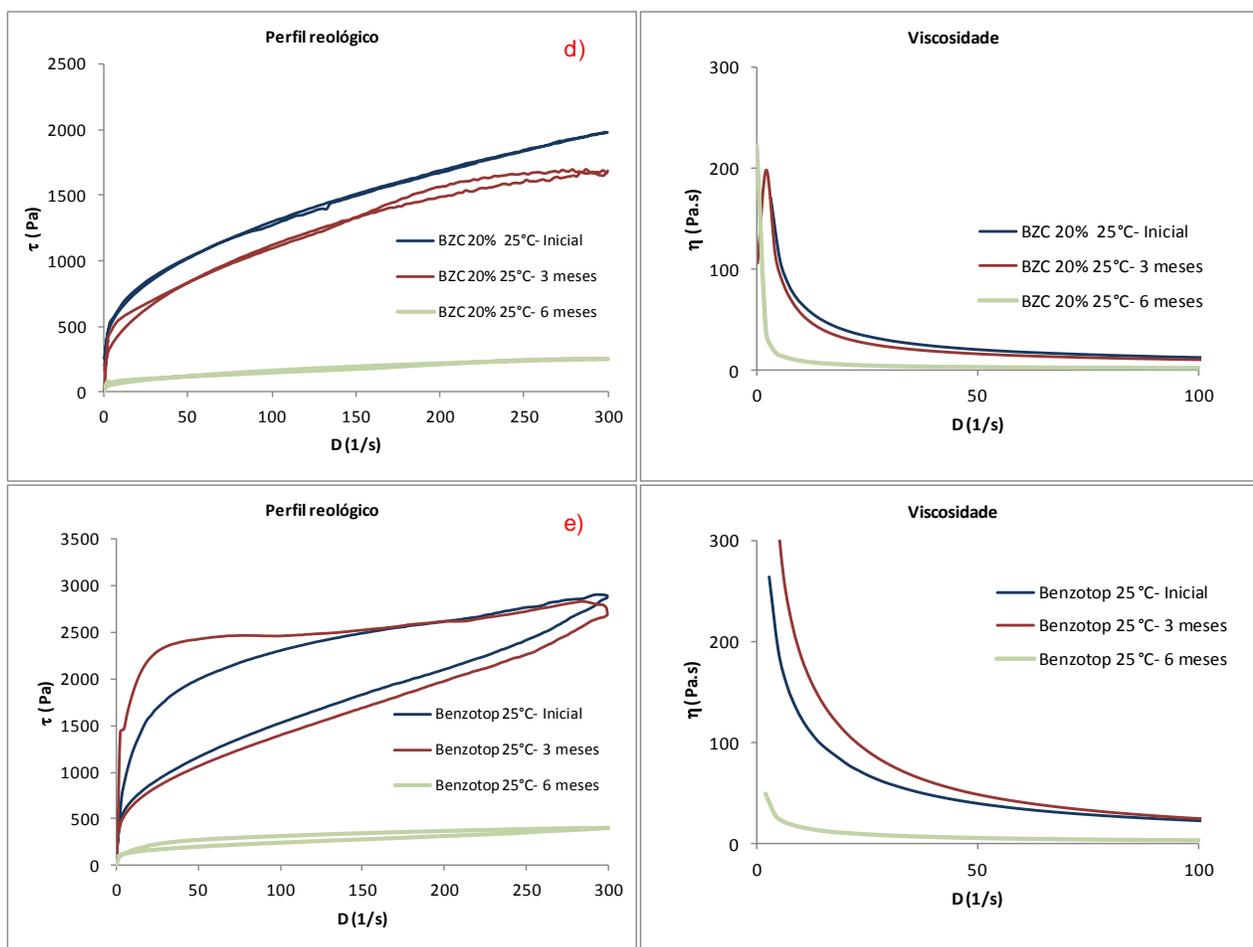


Figura 36. Variação na tensão de cisalhamento (esquerda) e viscosidade (direita) dos géis de Benzocaína em diferentes tempos após preparo (tempo inicial, 3 e 6 meses, medidos a 25°C.

a) BZC 10%; b) BZC 10% LC; c) BZC 10% LE; d) BZC 20%; e) Benzotop®

5.2.7. Avaliação in vitro da toxicidade das formulações de benzocaína em cultura de células (viabilidade celular)

A avaliação do efeito tóxico das formulações foi realizada através do ensaio de viabilidade celular, medida por redução do corante MTT em culturas de células não metabolizantes (fibroblastos de camundongos, da linhagem 3T3). As células foram tratadas com as formulações de benzocaína livre e encapsulada em lipossomas (convencionais e elásticos) e seus respectivos controles (placebo do gel simples, placebo do gel contendo lipossoma convencional e placebo do gel contendo lipossoma elástico) (Figura 37).

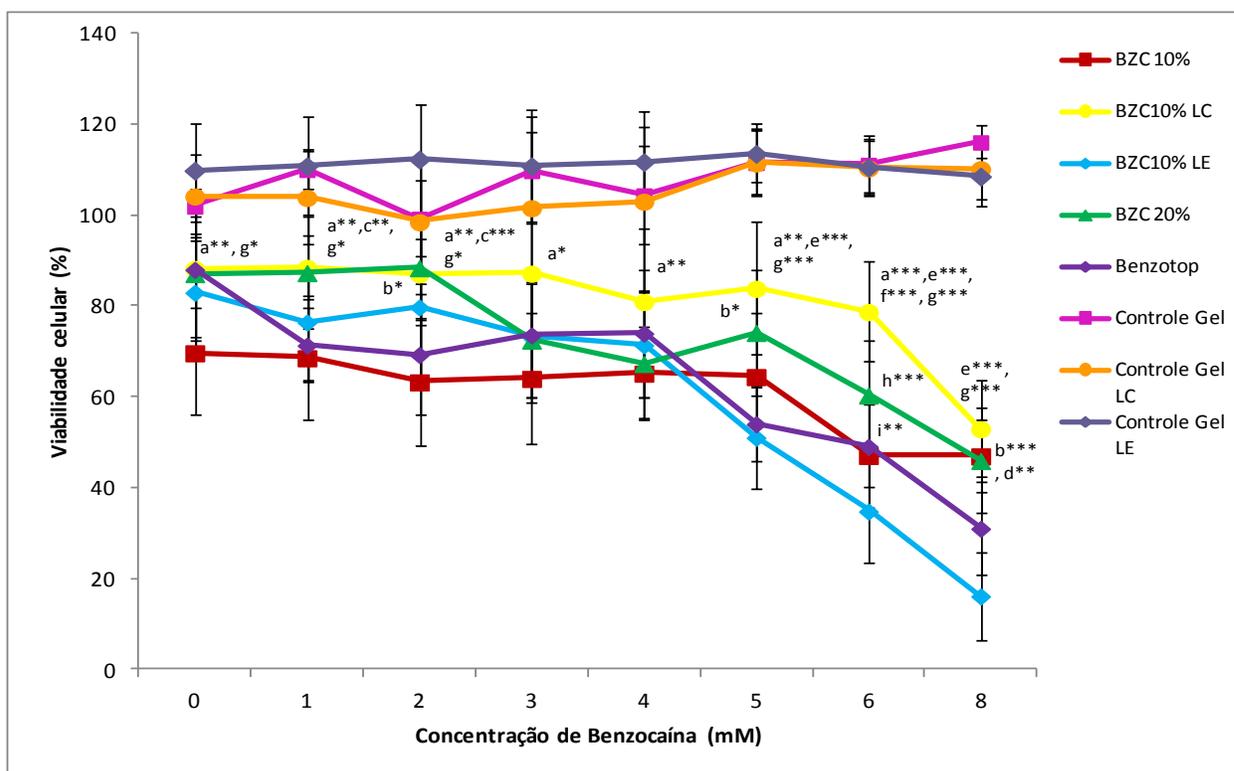


Figura 37. Testes de citotoxicidade: análise da viabilidade celular (teste do MTT) de fibroblastos 3T3 (Balb/C) após tratamento (2hs) com as formulações de benzocaína: BZC 10%, BZC 10% LC, BZC 10% LE, Benzotop e respectivos géis controle: gel controle, gel LC controle e gel LE controle. Dados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle com MTT \pm DP. n=5 experimentos. Análise estatística ANOVA/Tukey-Kramer, $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| a - BZC 10% vs BZC 10% LC | f - BZC 10% LC vs BZC 20% |
| b - BZC 10% vs BZC 10% LE | g - BZC 10% LC vs Benzotop |
| c - BZC 10% vs BZC 20% | h - BZC 10% LE vs BZC 20% |
| d - BZC 10% vs Benzotop | i - BZC 10% LE vs Benzotop |
| e - BZC 10% LC vs BZC 10% LE | |

De forma geral, foi observada uma diminuição da viabilidade celular nas células 3T3 tratadas com benzocaína. Por outro lado, as células tratadas com os controles (gel sem benzocaína) apresentaram viabilidade de cerca de 100%, em todas as concentrações avaliadas.

De maneira geral, os anestésicos locais apresentam alguma toxicidade celular. Essa toxicidade pode ser explicada por sua ação desestabilizadora de membranas biológicas devido às características anfífilas desses fármacos (Schreier et al., 2000), tal que, quanto mais hidrofóbico o anestésico, mais lítico ele é (Malheiros et al., 2004). Além disso, o efeito tóxico dos anestésicos locais em células pode ser devido à sua capacidade de interagir com

complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondriais (Dabadie et al., 1987; Sztark et al., 1997 ; Cela et al., 2010).

Os valores de IC₅₀ podem ser observados na Tabela 16. A formulação que induziu menor citotoxicidade às células foi o gel de BZC a 10% encapsulada em lipossomas convencionais, com o maior IC₅₀ encontrado. Ela se mostrou significativamente menos tóxica que as formulações BZC 10% LE e a formulação comercial (Benzotop[®]).

Tabela 16. Cálculo de IC₅₀ para as linhagens 3T3, após tratamento com as formulações em gel: BZC 10%, BZC 10% LC, BZC 10% LE e BZC 20%. Análise estatística ANOVA/Tukey-Kramer, p<0,05(*); p<0,01(**)

Formulação avaliada	IC ₅₀ (mM)
BZC 10%	5,46 ± 1,26
BZC 10% LC	6,98 ± 0,52 ^{a*,b**}
BZC 10% LE	4,81 ± 1,29
Benzotop [®]	3,47 ± 1,41
BZC 20%	5,44 ± 0,62

a - BZC 10% LC vs BZC 10% LE

b- BZC 10% LC vs Benzotop[®]

A outra formulação lipossomal estudada (BZC 10% LE), apresentou baixa viabilidade celular, quando comparada a formulação contendo lipossoma convencional . Como o controle do gel de lipossomas elásticos não se mostrou tóxico, descartamos a possibilidade de o aumento da toxicidade observada para BZC 10% LE ter sido causado pelos componentes da formulação (em especial PEG 8-L). No entanto, é possível que a interação de BZC com PEG-8L seja responsável pelo maior efeito tóxico da formulação BZC10% LE (em relação à LC), já que detergentes são bons solubilizadores de membranas biológicas (Schreier et al., 2000). A partição da benzocaína nas células 3T3 pode ter sido facilitada pelos lipossomas elásticos, o que ocasionou a queda na viabilidade celular.

Cabe ressaltar que o valor de IC₅₀ determinado para a formulação de BZC 10% LE, não foi significativamente maior (p>0,05) em relação aos géis comercial (Benzotop[®]) e BZC 10% (Tabela 16), isto é, não houve aumento da citotoxicidade.

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram uma diminuição do efeito citotóxico causado pela benzocaína em virtude da encapsulação do fármaco em lipossomas compostos de fosfatidilcolina:colesterol e α-tocoferol (4:3:0,07%mol) (Pinto, 2002). A

benzocaína complexada em β -Ciclodextrina, também demonstrou menor efeito citotóxico, porém em menor extensão (Pinto, 2002, Pinto et al., 2005).

Em outro estudo de citotoxicidade, a bupivacaína complexada com hidropropil- β -ciclodextrina também apresentou menor efeito citotóxico, comprovando o efeito de proteção celular conferido pela liberação sustentada do anestésico local da cavidade da ciclodextrina (Moraes et al., 2006).

5.2.8. Ensaio de liberação de benzocaína das formulações em gel

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado sob condição de dose infinita a fim de caracterizar o perfil de liberação da BZC a partir das diferentes formulações. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e porcentagem ($\%/\text{cm}^2$) de BZC liberada em função do tempo.

Na Figura 38 é possível observar que todas as formulações apresentaram um perfil de liberação semelhante. Não houve diferença significativa entre as quantidades de benzocaína liberada pelos diferentes géis. No entanto, quando a liberação é avaliada em termos de porcentagem de benzocaína liberada em relação à sua concentração na formulação (Figura 39) as formulações contendo 10% de benzocaína apresentaram um maior perfil de liberação, quando comparado aos géis de BZC 20% (Benzotop[®] e BZC 20%).

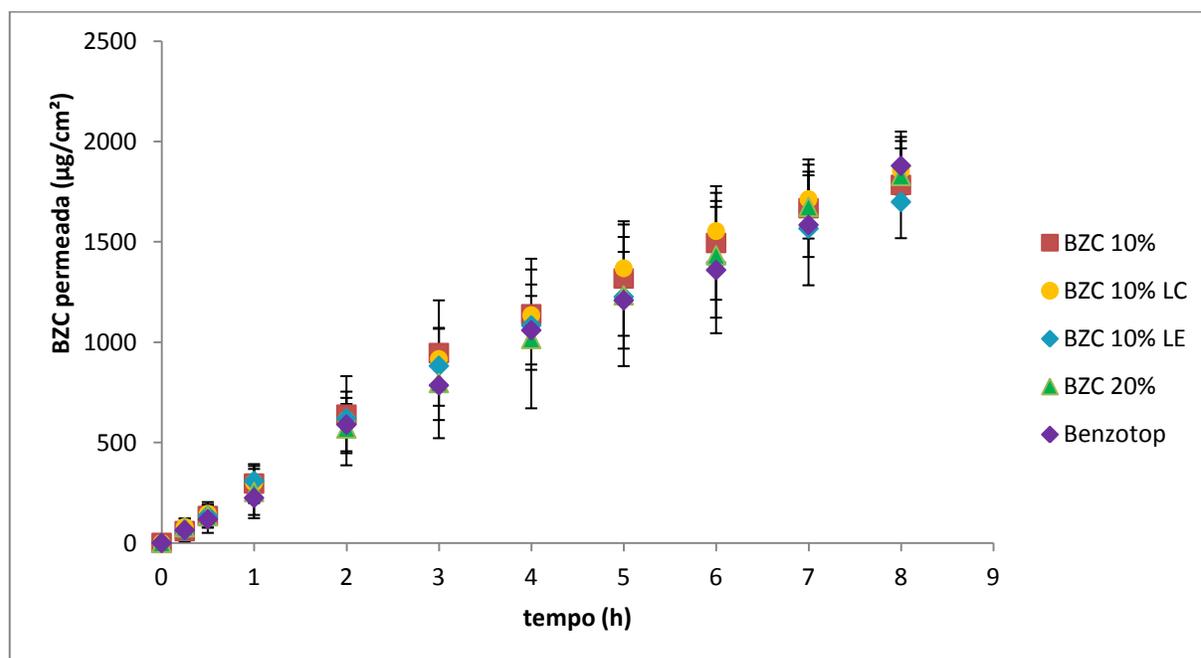


Figura 38. Perfis de liberação de benzocaína ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de membrana artificial com poro de 30 nm a partir das formulações em gel aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína

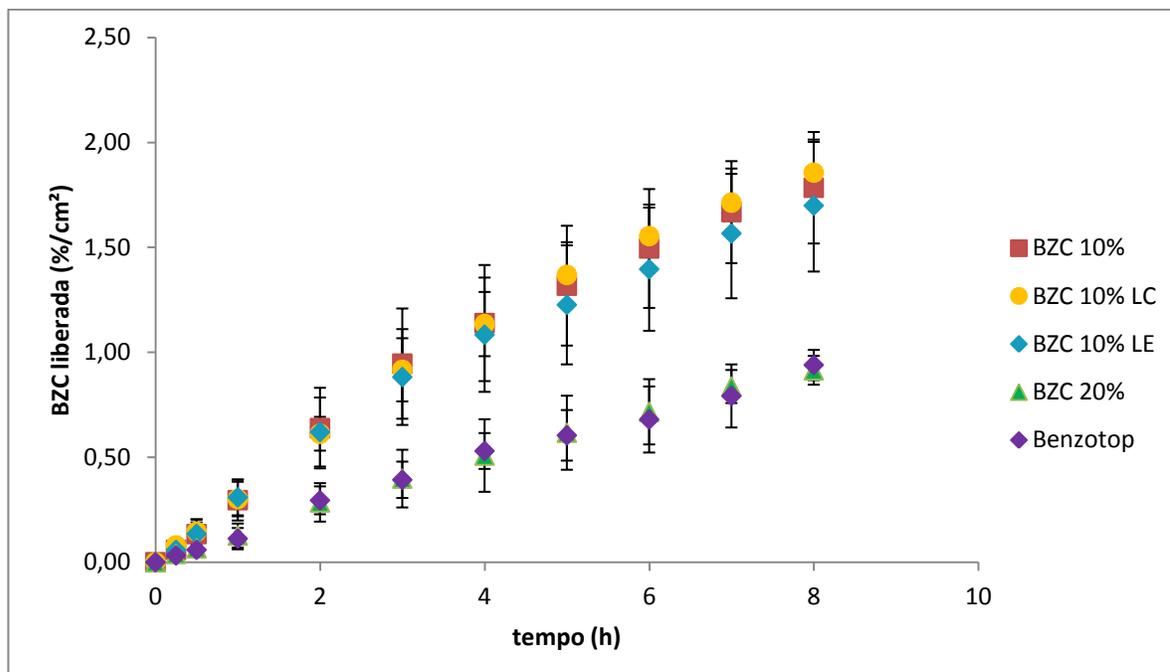


Figura 39. Perfis de liberação de benzocaína (%/cm²) através de membrana artificial com poro de 30 nm a partir das formulações em gel aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína.

A cinética de liberação das formulações foi avaliada por meio da aplicação de modelos matemáticos de linearização. Na tabela 17 estão sumarizados o coeficiente de correlação linear obtido para cada formulação. O modelo cinético de zero ordem apresentou um maior coeficiente de correlação para todas as formulações, indicando que o fluxo, independente da concentração do fármaco. Este modelo cinético é característico de formulações com doses infinitas (Sato et. al, 2007).

Tabela 17. Coeficientes de correlação obtidos com os modelos de zero ordem e Higuchi para liberação das formulações em gel de BZC aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína

	BZC 10%	BZC 10% LC	BZC 10% LE	BZC 20%	Benzotop [®]
Ordem Zero	0,971 ± 0,03	0,986 ± 0,02	0,973 ± 0,02	0,987 ± 0,03	0,980 ± 0,01
Higuchi	0,936 ± 0,07	0,899 ± 0,04	0,930 ± 0,05	0,902 ± 0,04	0,939 ± 0,03

Na tabela 18, estão descritos os valores de fluxo e tempo necessário para início da liberação (*time lag*), obtidos para cada formulação. A inclinação da reta no intervalo de tempo da porção mais linear do gráfico representa o fluxo de benzocaína através da membrana. Já a intersecção dessa mesma porção linear com o eixo das abscissas permitiu a determinação do *time lag* (Kaushik et al. 2010).

A formulação de BZC a 10% encapsulada em lipossomas convencionais foi aquela que apresentou maior fluxo em relação às demais formulações, sendo significativamente maior que o fluxo das formulações que não continham lipossomas (BZC 10%, BZC 20% e Benzotop). A formulação de Benzocaína encapsulada com lipossomas elásticos apresentou fluxo significativamente maior que o da formulação comercial Benzotop ($p < 0,05$), porém estatisticamente semelhante ao da BZC 10% LC.

Todas as formulações apresentaram valores de *time lag* muito próximos de 0, o que demonstra que a liberação do fármaco ocorreu imediatamente no início do experimento de liberação.

Tabela 18. Parâmetros de permeação de benzocaína a partir de diferentes composições de géis, através de membrana artificial (30nm).

	Fluxo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Time Lag (h)
BZC 10% (0-7 h)	241,12 \pm 26,90	0,10 \pm 0,18
BZC 10% LC (0-3 h)	293,96 \pm 22,90 ^{a,b*,c***}	0,04 \pm 0,05
BZC 10% LE (0-7 h)	276,88 \pm 25,40 ^{d*}	0,38 \pm 1,06
BZC 20% (0-7h)	232,83 \pm 33,66	0,02 \pm 0,04
Benzotop (0-3h)	216,37 \pm 13,08	0,04 \pm 0,09

a- BZC10% vs BZC 10% LC

c- BZC 10% LC vs Benzotop

b- BZC 10% LC vs BZC 20%

d- BZC 10% LE vs Benzotop

Liebenberg e colaboradores (2004), avaliaram o uso de diferentes aparatos para realização do teste de liberação de produtos semi-sólidos e descreveu o uso da célula de Franz como sendo uma forma simples e eficiente de se comparar formulações. Embora o teste de liberação *in vitro* não tenha sido desenvolvido para atestar a bioequivalência entre produtos, este teste auxilia na sua comparação em testes de qualidade, desenvolvimento de formulações, aumentos de lote e alterações nas formulações.

Outros pesquisadores avaliaram diferentes parâmetros que poderiam influenciar a liberação *in vitro* de alguns glicocorticóides. Os resultados indicaram que os fluxos obtidos com membrana de acetato/nitrato de celulose e com membrana de polissulfona foram semelhantes. Os autores concluíram que as características das membranas de modo geral não contribuem para o fluxo de liberação de fármacos de formulações tópicas, desde que haja porosidade

suficiente para criar um microambiente de contato entre formulação e meio receptor (Shah et al., 1999).

Embora o teste de liberação não tenha como prever o comportamento *in vivo* das formulações na pele, face às particularidades da penetração cutânea, o comportamento obtido pode ajudar na avaliação de alguns aspectos. O maior fluxo apresentado pelas formulações preparadas em nosso laboratório possibilitam maior partição do fármaco no meio receptor que a formulação comercial. Se esse mesmo comportamento ocorrer *in vivo*, pode-se extrapolar que uma maior quantidade de benzocaína estará disponível para a penetração na pele em um menor tempo a partir do produto.

5.2.9. Ensaio de permeação in vitro através da pele

Os dados de permeação das formulações à base de BZC através da pele estão apresentados na figura 40 e 41. Da mesma maneira que no ensaio de liberação, a permeação da BZC foi apresentada em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $\%/ \text{cm}^2$ de BZC permeada em função do tempo. Os resultados de permeação diferiram dos resultados da liberação, porém em ambos os casos foi possível observar melhor desempenho das formulações preparadas em nosso laboratório em relação à formulação comercial.

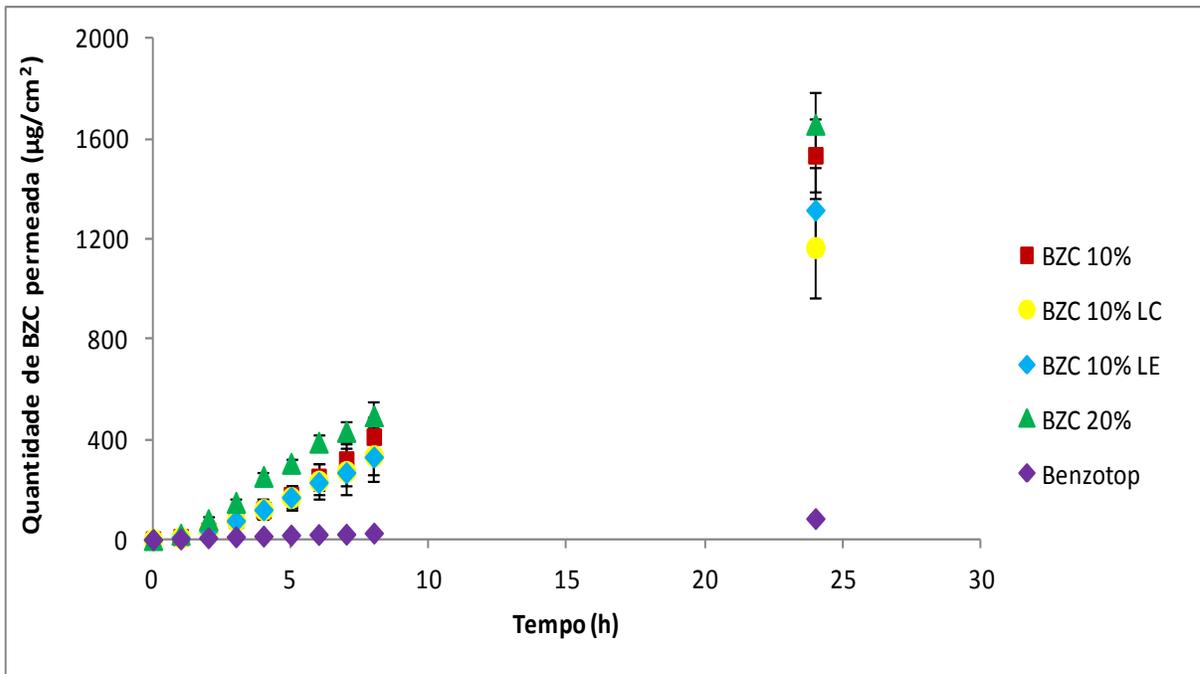


Figura 40. Perfis de liberação de benzocaína ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) através de pele de orelha de porco a partir das formulações em gel aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína. Dados apresentados como média e desvio padrão ($n=6-8$)

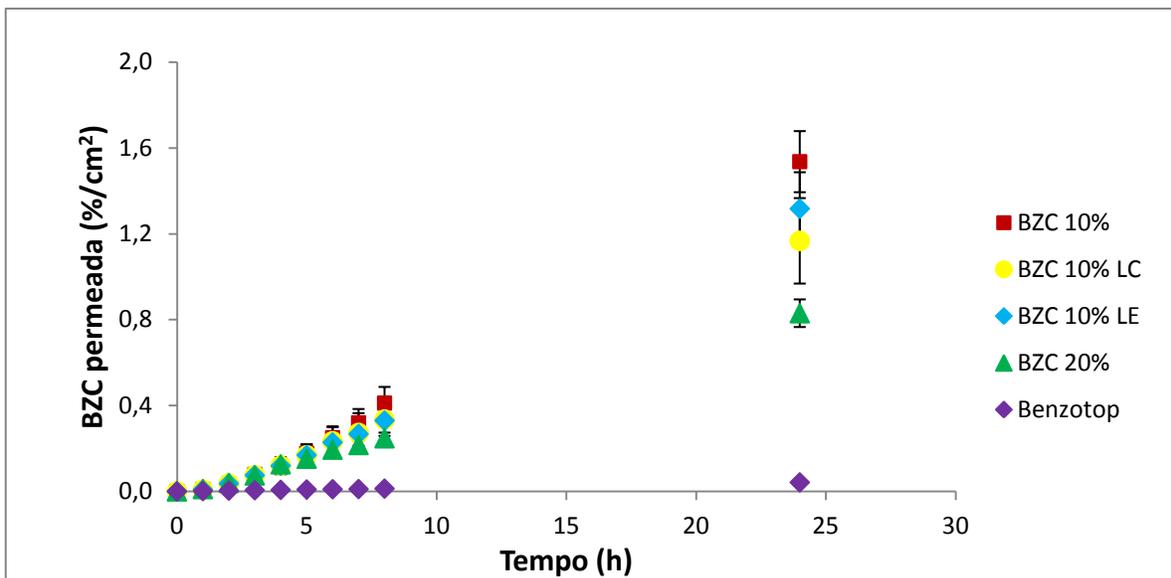


Figura 41. Perfis de liberação de benzocaína ($\text{\%}/\text{cm}^2$) através de pele de orelha de porco a partir das formulações em gel aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína. Dados apresentados como média e desvio padrão ($n=6-8$)

A cinética de permeação das formulações também foi avaliada. O modelo cinético de zero ordem foi o que apresentou maior coeficiente de correlação, concordando com os resultados encontrados nos testes de liberação (tabela 19).

Tabela 19. Coeficientes de correlação obtidos com os modelos de zero ordem e Higuchi para permeação das formulações em gel de BZC aqui preparadas e da formulação comercial de benzocaína

	BZC 10%	BZC 10% LC	BZC 10% LE	BZC 20%	Benzotop®
Ordem Zero	0,986 ± 0,01	0,979 ± 0,02	0,986 ± 0,01	0,998 ± 0,00	0,993 ± 0,01
Higuchi	0,794 ± 0,02	0,788 ± 0,06	0,794 ± 0,02	0,854 ± 0,01	0,904 ± 0,01

Todos os géis preparados em nosso laboratório, mesmo contendo metade da concentração do anestésico local (BZC 10%), apresentaram fluxo significativamente maior quando comparado ao gel comercial a 20% (Tabela 20). Os géis lipossomais e não lipossomais preparados em nosso laboratório não apresentaram diferenças significativas em relação ao fluxo e *time lag* conforme tabela 20.

As formulações contendo 20% de fármaco, apresentaram menor *time lag* quando comparadas às formulações preparadas com 10% de BZC. Isso pode ser explicado pela maior quantidade de fármaco disponível para iniciar a permeação.

No teste de liberação, a formulação de BZC 10% LC (tabela 18), apresentou um fluxo maior que as formulações não lipossomais, no entanto, no teste de permeação os resultados não concordaram com aqueles encontrados no teste de liberação. No teste de permeação, todas as formulações preparadas no laboratório apresentaram fluxos significativamente iguais e um *time lag* maior para todas as formulações, quando comparado aquele encontrado no teste de liberação. Isso pode ser explicado pela diferente interação das formulações na presença da pele, que possui uma composição mais complexa e maior apolaridade que a membrana sintética.

A diferença entre o comportamento das formulações preparadas em nosso laboratório e a formulação comercial pode estar relacionada à diferente composição das mesmas. Formulações contendo a mesma quantidade do fármaco, mas diferentes excipientes podem produzir diferente transporte através da pele, principalmente devido a diferenças na solubilidade e partição do fármaco. A força de direcionamento para difusão transdérmica do fármaco é resultado da atividade termodinâmica do permeante no veículo (de Araújo et al., 2010). A diferença entre a composição e quantidade de BZC dos géis lipossomais e não

lipossomais das formulações preparadas em nosso laboratório provavelmente não interferiu na atividade termodinâmica da BZC observado pelos semelhantes perfis de permeação e fluxo dessas formulações através da pele.

Tabela 20. Parâmetros de permeação de benzocaína a partir de diferentes composições de géis, através de pele de orelha de porco

	Fluxo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Time Lag (h)
BZC 10% (4-8 h)	72,88 \pm 10,23 ^{a***}	2,52 \pm 0,26
BZC 10% LC (4-8 h)	48,10 \pm 16,51 ^{b*}	1,91 \pm 0,04
BZC 10% LE (4-8 h)	52,77 \pm 11,95 ^{c**}	1,88 \pm 0,31
BZC 20% (4-8h)	68,62 \pm 10,16 ^{d***}	0,30 \pm 0,52 ^{e***,f***,g***}
Benzotop (2-5h)	5,52 \pm 1,62	0,71 \pm 1,16 ^{a***,b***,c***}

a-BZC10% vs Benzotop

b-BZC 10% LC vs Benzotop

c-BZC 10% LE vs Benzotop

d- BZC 20% vs Benzotop

e- BZC 10% vs BZC 20%

f- BZC 10%LC vs BZC 20%

g-BZC 10% LE vs BZC 20%

VI. CONCLUSÕES

- As formulações lipossomais apresentaram baixo nível de peroxidação, mesmo após 6 meses de estabilidade a quantidade encontrada não representa porcentagem significativa da concentração total de lipídios presentes nas formulações lipossomais. O uso de α -tocoferol nos lipossomas elásticos pode ser uma alternativa interessante de diminuir sua peroxidação, já que os lipossomas elásticos apresentaram maior peroxidação que os lipossomas convencionais, provavelmente pela ausência deste antioxidante na sua composição.
- O pH de todos os géis analisados não variou durante o período de armazenamento, O teor de BZC também se manteve estável, não tendo variado mais que 5% do seu valor inicial, estando dentro dos limites especificados pela legislação.
- O estudo de reologia demonstrou que os géis preparados em nosso laboratório possuem uma menor viscosidade, quando comparados ao produto comercial, e também apresentam menor histerese, característica favorável que demonstra estabilidade das formulações. As formulações teste compostas por lipossomas foram as que demonstraram possuir maior estabilidade em suas características reológicas, tendo apresentado maior estabilidade que o produto comercial.
- A formulação que induziu menor citotoxicidade às células foi o gel de BZC a 10% encapsulada em lipossomas convencionais, com o maior IC_{50} encontrado. Ela se mostrou significativamente menos tóxica que as demais formulações em todas as concentrações avaliadas ($p < 0,05$).
- A formulação de Benzocaína a 10% encapsulada em lipossomas convencionais foi aquela que apresentou maior fluxo através de membranas artificiais de 30 nm, sendo este resultado significativamente maior que o fluxo apresentado pelas formulações que não continham lipossomas (BZC 10%, BZC 20% e Benzotop). A formulação de Benzocaína encapsulada com lipossomas elásticos também apresentou um fluxo significativamente maior que a formulação comercial (Benzotop).
- No teste de permeação, todos os géis preparados em nosso laboratório apresentaram fluxo significativamente maior que o gel comercial. O fluxo dos géis lipossomais e não lipossomais preparados em nosso laboratório não apresentaram diferenças significativas. O fato das formulações lipossomais não terem apresentado um fluxo maior que as formulações não lipossomais, como esperado, pode ser explicado pela grande quantidade de fármaco presente nas formulações, o que faz com que o efeito esperado pelos lipossomas seja mascarado.

- Apesar da formulação contendo lipossomas elásticos não ter apresentado maior permeação através da pele em relação à formulação contendo lipossomas convencionais, de uma forma geral, as formulações preparadas em nosso laboratório, em especial aquelas preparadas com lipossomas apresentaram boa estabilidade, alta taxa de liberação e permeação e baixa citotoxicidade demonstrando grande superioridade quando comparados à formulação comercial.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, T. (1997). **Particle Size Measurements**. London: Chapman & Hall, 595

Allen Jr, L. V., Popovich, N. G., Ansel, H. C. (2007). **Formas Farmacêuticas e Sistemas de liberação de fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 420-456.

Al-Malah, K. (2006). Rheological Properties of Carbomer Dispersions. **Ann. T. Nord. Rheol. Soc.** 14,

Alsante. K. M., Ando, A., Brown, R., Ensing. J., Hatajik, T.D. (2006). The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** 59, 29-37

American Academy of Pediatrics, committee on drugs. (1997). Alternative routes of drugs administration-advantages and disadvantages (subject review). **Pediatrics.** 100, 143-152.

Asakawa, T., Matsushita, S. (1980). Coloring Conditions of Thiobarbituric Acid Test for Detecting Lipid Hydroperoxides. **Lipids** 15, 137-140.

AstraZeneca Pharmaceuticals, USA. 2004. Rev 05/05. EMLA full prescription information [online]. Accessed on May 6th 2009. URL: <http://www.astrazeneca-us.com/pi/EMLA.pdf>.

Auton, M. E. (2005). **Delineamento de Formas Farmacêuticas** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 112-123

Benzotop: benzocaína (2010). Evaldo R. de Oliveira. Rio de Janeiro: DFL. Bula de remédio

Bouwstra, J. A., Graaff, A., Groenink, W., Honeywell, L. (2002). Elastic vesicles: interaction with human skin and drug transport. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 7, 222-223.

Bouwstra, J. A., Honeywell-Nguyen, P. L. (2002). Skin structure and mode of action of vesicles. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 54, S41-S55.

Bouwstra, J. A., Honeywell-Nguyena, P. L., Goorisa, G. S., Ponec, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progr. Lipid Res.** **42**, 1-36.

BRASIL, RDC nº 67 de 8 de outubro 2007 – “Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias” – Guia disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 20 março de 2010.

BRASIL, RE nº 1 de 29 de julho de 2005 – “Guia para a realização de estudos estabilidade” – Guia disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 20 março de 2010.

BRASIL, RE 899 de 29 de maio de 2003 – “Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” – Guia disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 20 março de 2010.

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.

Carter, E. L., Coppola, C. A., Barsanti, F. A. (2006). A randomized, double-blind comparison of two topical anesthetic formulations prior to electrodesiccation of dermatosis papulosa nigra. **Dermatol. Surg.** **32**,1-6.

Carvalho, J. C. A. (1994). Farmacologia dos anestésicos locais. **Rev. Bras. Anesthesiol.** **44**, 75-82.

Castillo, J. G. (1999). Topical anesthetic formulation. United States Patent Number US 5993836

Catterall, W. A., Mackie, K. (1996). Anestésicos locais. In: Goodman, L. S., Gilman, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. Mexico: McGraw-Hill Interamericana.

Cavalcanti, I. L., Gozzani, J. L., Sampaio Filho, A. A., Alves Neto, O., Garcia, J. B. S. (2004). **Dor pós-operatória**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Anestesiologia/SBA

Cela, O., Piccoli, C., Scrima, R., Quarato, G., Marolla, A., Cinnella, G., Dambrosio, M., Capitanio, N. (2010). Bupivacaine uncouples the mitochondrial oxidative phosphorylation, inhibits respiratory chain complexes I and III and enhances ROS production: results of a study on cell cultures. **Mitochondrion**. **10**, 487-96.

Cereda, M. S. C., Brunetto, G. B., de Araújo, D. R., de Paula, E. (2006). Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. **Can. J. Anesth.** **53**, 1092-1097

Cereda, M. S. C., Tófoli, G. R., de Brito Junior, R. B., de Jesus, M. B., Fraceto, L. F., Groppo, F. C., de Araújo, D. R., de Paula, E. (2008). Stability and Local Toxicity Evaluation of a Liposomal Prilocaine Formulation. **J. Liposome Res.** **18**, 329-339

Cestele, S., Catterall, W. A. (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**. **82**, 883-892.

Cevc, G. (1996). Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.** **13**, 257-388.

Cevc, G. (2004). Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Adv. Drug Deliv. Rev.** **56**, 675-711.

Cevc, G., Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. **Biochim. Biophys. Acta.** **1104**, 226-232.

Cevc, G., Blume, G., Schatzlein, A. (1997). Transfersomes-mediated transepidermal delivery improves the regio-specificity and biological activity of corticosteroids in vivo. **J. Control Release.** **45**, 211–226.

Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein, A., Blume, G. (1998). Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. **Biochim. Biophys. Acta.** **1368**, 201-15

Cevc, G., Blume, G. (2004). Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. **Biochim. Biophys. Acta.** **1663**, 61-73.

Cordoni, A., Cordoni, L. E. (2001). Eutectic mixture of local anesthetics reduces pain during intravenous catheter insertion in the pediatric patient. **Clin. J. Pain.** **17**, 115-8.

Cornelio, R., Mayorga, P. (2007). Estudo de Penetração Cutânea do Flurbiprofeno. **Lat. Am. J. Pharm.** **26**, 883-888.

Corrêa, N. M., Júnior, F. B. C., Ignácio, R. F., Leonardi, G. R. (2005). Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farmac.** **41**, 73-78

Covino, B. G. (1986). Pharmacology of local anaesthetic agents. **Br. J. Anaesth.** **58**, 701-716

Covino, B. G., Vassallo, H. (1976) in: **Local Anaesthetics: Mechanisms of Action and Clinical Use**, Grune and Stratton, NewYork.

Dabadie, P., Bendriss, P., Erny, P., Mazat, J. P. (1987). Uncoupling effects of local anesthetics on rat liver mitochondria. **FEBS Lett.** **226**, 77-82.

Dahshan, A., Donovan, G. K. (2006). Severe Methemoglobinemia Complicating Topical Benzocaine Endoscopy in a Toddler: A Case Report and Review of Literature. **Pediatrics.** **117**, 806-809.

Darr, A. (1979) **Tecnologia farmacêutica**. Berlim: Aníbia. 366.

de Araújo, D. R. (2005). **Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-amidas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

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**, 566-572.

de Araújo D. R., de Paula, E., Fraceto, L. F. (2008a). Anestésicos locais: Interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Quim. Nova** **31**, 1775–1783.

de Araujo, D. R., Cereda, C. M. S., Brunetto, G. B., Vomero, V. U., Pierucci, A., Santo Neto, H., Oliveira, A. L. R., Fraceto, L. F., Braga, A. F. A., de Paula, E. (2008b). Pharmacological and local toxicity studies of liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. **J. Pharm. Pharmacol.** **60**, 1449-1457.

de Araujo, D. R., Padula, C., Cereda, C. M. S., Tófoli, G. R., Brito Jr., R. B., de Paula, E., Nicoli, S., Santi, P. (2010). Bioadhesive films containing benzocaine: correlation between in vitro permeation and in vivo anesthetic effect. **Pharm. Res.** **27**, 1677-1686

de Melo, N. F. S., Grillo, R., Rosa, A. H., Fraceto, L. F., Dias Filho, M. L., de Paula, E., de Araújo, D. R. (2010). Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Quím. Nova.** **33**, 65-69.

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**, 271-277.

de Jong, R. H. (1994). **Local anesthetics**. U.S.A: Mosby-Year Book.

de Paula, E., Schreier, S. (1995). Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. **Biochim. Biophys. Acta** **1240**, 25–33

de Paula, E., Cereda, C. M. S., Tofoli, G. R., Franz-Montan, M., Fraceto, L. F., Araújo, D. R. (2010). Drug Delivery systems for local anesthetics. **Recent. Pat. Drug Deliv. Formul.** **4**, 23-34.

Duclohier, H. (2009). Structure-function studies on the voltage-gated sodium channel. **Biochim. Biophys. Acta.** **1788**, 2374-2379

Eekhof, J. A., de Kanter, J. S., Assendelf, W. J., Krijger, J. M., Bouvy, M. L., Cheung, K. C. (2006). Coma in a child after treatment with the 'magic salve' lidocaine-prilocaine cream. **Ned. Tijdschr. Geneesk.** **150**, 1805-1807

El Maghraby, G. M. M., Williams, A. C., Barry, B. W. (1999). Skin delivery of estradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. **J. Pharm. Pharmacol.** **51**, 1123–1134

Elsayed, M. M., Abdallah, O. Y., Naggar, V. F., Khalafallah, N. M. (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. **Int. J. Pharm.** **332**, 1-16.

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.

Elsaie, M.L. & Baumann, L.S. (2008). Evaluation of liposomal delivery system for topical anaesthesia. **Cutis.** **81**, 285, 289

ICH (2003). Guidance for Industry: Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products.

FDA U.S. Food and Drug Administration (1997). **Nonsterile Semisolid Dosage Forms – Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; *In vitro* Release Testing and *In vivo* Bioequivalence.** Disponível em: <http://www.fda.gov/>. Acesso em 10 de janeiro de 2011.

Fesq, H., Lehmann, J., Kontny, A., Erdmann, I., Theiling, K., Rother, M., Ring, J., Cevc, G., Abeck, D. (2003). Improved risk–benefit ratio for topical triamcinolone acetonide in Transfersome[®] in comparison with equipotent cream and ointment: a randomized controlled trial. **Brit. J. Dermatol.** **149**, 611-619.

Ferreira, A. O. (2008). **Guia prático da farmácia magistral**: 3.ed. São Paulo: Pharmabooks.

Ferreira, P. E. M., Martini, R. K. (2001). Cocaína: lendas, história e abuso. **Rev. Bras. Psiquiatr.** **23**, 96-99

Fetzer, S. J. (2002). Reducing venipuncture and intravenous insertion pain with eutectic mixture of local anesthetic: a meta-analysis. **Nurs Res.** **51**,119-24.

Fisher, R., Hung, O., Mezei, M., Stewart, R. (1998). Topical anaesthesia of intact skin: liposome-encapsulated tetracaine vs EMLA. **Br. J. Anaesth.** **81**, 972–973.

Florence, A. T., Attwood, D. (2003). **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**, 3. ed. São Paulo: EDUSP.

Foldvari, M., Gesztes, A., Mezei, M. (1990a) Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electron microscopic studies. **J. Microencapsul.** **7**, 479-89.

Foldvari, M., Jarvis, B., Oguejiofot, C. J. N. (1990b). Topical dosage form of liposomal tetracaine: Effect of additives on the in vitro release and in vivo efficacy. **J. Control. Release.** **27**, 193-205

Fraceto, L. F., Oyama, Jr. S., Nakaie, C. R., Spisni, A., de Paula, E., Pertinez, T. A., (2006). Interaction of Local Anesthetics with a Peptide encompassing the IV/S4 –S5 linker of the Na⁺ channel. **Biophys. Chem.** **124**, 29-39

Franz-Montan, M., Silva, A. L., Cogo, K., Bergamaschi, C. de C., Volpato, M. C., Ranali, J., de Paula, E., Groppo, F. C. (2007). Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. **Anesth. Analg.** **104**, 1528-1531.

Franz-Montan, M., de Paula, E., Groppo, F. C., Silva, A. L., Ranali, J., Volpato, M. C. (2010a). Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** **6**, 800-804.

Franz-Montan, M., Silva, A. L., Fraceto, L. F., Volpato, M. C., Paula, E., Ranali, J., Groppo, F. C. (2010b). Liposomal encapsulation improves the duration of soft tissue anesthesia but does not induce pulpal anesthesia. **J. Clin. Anesth.** **22**, 313-7

Franz-Montan, M., Cereda, C. M. S., de Araujo, D. R., Zanchetta, B., Santana, M. H. A., Novaes, P. D., Narvaes, E., de Paula E. (2011). Characterization of a Benzocaine formulation in Elastic Liposomes. In: **23rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Abstract number 219.

Franz-Montan, M., de Paula, E., Groppo, F.C., Silva, A. L. R., Ranali, J., Volpato, M. C. (2012). Liposomal delivery system for topical anaesthesia of the palatal mucosa. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.** **50**, 60-64.

Fresta, M., Puglisi, G. (1996). Application of liposomes as potential cutaneous drug delivery systems: in vitro and in vivo investigation with radioactivity labeled vesicles. **J. Drug Target.** **4**, 95–101.

Friedman, P. M., Mafong, E. A, Friedman, E. S., Geronemus, R. G. (2001). Topical anesthetics update: EMLA and beyond. **Dermatol. Surg.** **27**, 1019-1026

Gesztes, A., Mezei, M. (1988). Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. **Anesth. Analg.** **67**, 1079-1081

Gaspar, L. R., Campos, P. M. B. G. M. (2003). Rheological behavior and SPF of sunscreens. **Int. J. Pharm.** **250**, 35-44.

Gilliard, J. A., Cumps, J. L., Tilquim, B. L. (1993). Efficiency of an automatic peak purity control procedure in high performance liquid chromatography-photodiode array coupling based on evolving factor analysis. **Chemometr. Intell. Lab.** **21**, 235-242.

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.

Gratieri, T., Gelfuso, G. M., Lopez, R. F. V. (2008). Princípios básicos e aplicação da iontoforese na permeação cutânea de fármacos. **Quim. Nova** **31**, 1490-1498.

Grillo, R. (2011). **Desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para herbicidas triazínicos utilizando nanocápsulas poliméricas**. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Gupta, S. P. (1991). Quantitative structure-activity relationship studies on local anesthetics. **Chem. Rev.** **91**, 1109-1119.

Gupta, A. K., Sibbald, R. G. (1996). Eutectic lidocaine/prilocaine 5% cream and patch may provide satisfactory analgesia for excisional biopsy or curettage with electrosurgery of cutaneous lesions. A randomized, controlled, parallel group study. **J. Am. Acad. Dermatol.** **35**, 419-423.

Gursoy, A., Ertugrul, D. T., Sahin, M., Tutuncu, N. B., Demirer, A. N., Demirag, N. G. (2007). The analgesic efficacy of lidocaine/prilocaine (EMLA) cream during fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. **Clin. Endocrinol.** **66**, 691-694.

Guterres, S. S., Poletto, F. S., Colomé, L. M., Raffi, R. P., Pohlmann, A. R. (2010). **Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery An Overview**. In Colloids in Drug Delivery.1 ed. United States: CRC Press Taylor & Francis Group.

Haas, L. F. (1995) Coca shrub (*Erythroxylum coca*). **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.** **59**, 25.

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**:1850-1856.

Honeywell-Nguyen, P. L., Graaff, A. M., Wouter Groenink, H. W., Bouwstra, J. A.. (2002). The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. **Biochim. Biophys. Acta.** **1573**,130-140.

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**, 707-711.

INMETRO – DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. Revisão 01: março 2003.

Isaac, V. L. B, Cefali, L. C, Chiari, B. G., Oliveira, C. C. L. G., Salgado H. R. N., Corrêa, M. A. (2008). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.** **29**, 81-96.

Islam, M. T., Rodriguez-Hornedo, N., Ciotti, Susan, Ackermann, C. (2004). Rheological Characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. **Pharm. Res.** **21**, 1192-1199.

Jesorka, A., Orwar, O. (2008). Liposomes: Technologies and Analytical Applications. **Annu. Rev. Anal. Chem.** **1**, 801- 832

Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2008) **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kaweski, S. (2008). Topical anesthetic creams. **Plast. Reconstr. Surg.** **121**, 2161-2165.

Kaushik, D., Costache, A., Michniak-Kohn, B. (2010). Percutaneous penetration modifiers and formulation effects. **Int. J. Pharm.** **386**, 42-51.

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**, 977-982.

Koscielniak-Nielsen, Z., Hesselbjerg, L., Brushøj, J., Jensen, M. B., Pedersen, H. S. (1998). EMLA patch for spinal puncture. A comparison of EMLA patch with lignocaine infiltration and placebo patch. **Anaesthesia.** **53**, 1218-1222.

Lachman, L., Lieberman, H. A., Kaning, J. L (2001). **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Volume II. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Lähteenmäki, T., Lillieborg, S., Ohlsén, L., Olenius, M., Strömbeck, J. O. (1988). Topical analgesia for the cutting of split-skin grafts: a multicenter comparison of two doses of a lidocaine/prilocaine cream. **Plast. Reconstr. Surg.** **82**, 458-462.

Leonardi, G. R., Maia Campos, P. M. B. G. (2001). Estabilidade de formulações cosméticas. **Int. J. Pharm. Comp.** **03**, 154-156.

Liebenberg, W., Engelbrecht, E., Wessels, A., Devarakonda, B., Yang, W., Villiers, M. M. (2004). Comparative Study of the Release of Active Ingredients from Semisolid Cosmeceuticals Measured with Franz, Enhancer or Flow-Through Cell Diffusion Apparatus. **J. Food Drug Anal.** **12**, 19-28

Maestrelli, F., Capasso, G., Gonzalez-Rodriguez, M. L., Rabasco, A. M., Ghelardini, C., Mura, P. (2009). Effect of preparation technique on the properties and in vivo efficacy of benzocaine-loaded ethosomes. **J. Liposome Res.** **4**, 1-8.

Malamed, S. F. (2006). **Manual de anestesia local**. 5. ed. Madrid: Elsevier España. S.A.

Malheiros, S. V., Pinto, L. M., Gottardo, L., Yokaichiya, D. K., Fraceto, L. F., Meirelles, N.C., de Paula, E. (2004) A new look at the hemolytic effect of local anesthetics, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4. **Biophys. Chem.** **110**. 213-221.

Martin, A. (1993). **Physical Pharmacy**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 153-476.

Martin, D. G., Watson, C. E., Gold, M. B., Woodard, C. L. and Baskin, S. I. (1995). Topical anesthetic-induced methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia in macaques: A comparison of benzocaine and lidocaine. **J. Appl. Toxicol.** **15**, 153–158

Massey, B. S. (2002). **Mecânica dos fluídos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 998

McLure, H. A., Rubin, A. P. (2005). Review of local anaesthetic agents. **Minerva Anesthesiol.** **71**, 59-74

Mezei, M., Gulasekharam, V. (1980). Liposomes -a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form. **Life Sci.** **18**, 1473-1477

Mishra, D., Garg, M., Dubey, V., Jain, S., Jain, N. K. (2007). Elastic liposomes mediated transdermal delivery of an anti-hypertensive agent: propranolol hydrochloride. **J. Pharm. Sci.** **96**, 145-155.

Moghimi, S. M., Szebeni, J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. **Prog. Lipid Res.** **42**, 463–478

Mohanraj, V. J., Chen, Y. (2006). Nanoparticles - a Review. **Trop. J. Pharm. Res.** **5**, 561-573.

Moraes, C. M., Araújo, D. R., Issa, M. G., Ferraz, H. G., Yokaichiya, F., Franco, M. K. K. D., Mazzaro, I., Lopes, P. S., Gonçalves, M. M., de Paula, E., Fraceto, L. F. (2006). Inclusion complex of S(-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: study of morphology and cytotoxicity. **Rev. Ciênc. Farm. Básica. Apl.** **27**, 207-212

Moriarty, K. M., Alagna, S. W., Lake, C. R. (1984). Psychopharmacology. An historical perspective. **Psychiatr. Clin. North Am.** **7**, 411-433.

Mura, P., Maestrelli, F., González-Rodríguez, M. L., Michelacci, I., Ghelardini, C., Rabasco, A. M. (2007). Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine loaded liposomes. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** **67**, 86-95.

Mura, P., Capasso, G., Maestrelli, F., Furlanetto S. (2008). Optimization of formulation variables of benzocaine liposomes using experimental design. **J. Liposome Res.** **18**, 113-125.

Muramatsu, M., Kanada, K., Nishida, A., Ouchi, K., Saito, N., Yoshida, M. Shimoaka, A., Ozeki, T., Yuasa, H., Kanaya, Y. (2000). Application of Carbopol to controlled release preparations I. Carbopol as a novel coating material. **Int. J. Pharm.** **199**, 77-83.

Netz, P. A., Ortega, G. G. (2002). **Fundamentos da físico-química: Uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas.** Porto Alegre: Artmed, 299.

Ngwa, G. (2010). Forced Degradation as na Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. **Drug Del. Technol.** **10**, 56-59.

Nusstein, J. M., Beck, M. (2003). Effectiveness of 20% Benzocaine as a Topical Anesthetic for Intraoral Injections. **Anesth. Prog.** **50**, 159-163

Parker, J. F., Vats, A., Bauer, G. (2004). EMLA toxicity after application for allergy skin testing. **Pediatrics.** **113**, 410-411.

Patel, H. M. (1985). Liposomes as a controlled-release system. **Biochem. Soc. Trans.** **2**, 513-516

Paul, A., Cevc, G. (1995). Noninvasive administration of protein antigens: transdermal immunization with bovine serum albumin in transfersomes. **Vaccine Res.** **4**, 145–164.

Paul, A., Cevc, G., Bachhawat, B. K. (1995). Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. **Eur. J. Immunol.** **25**, 3521–3524.

Pérez-Lozano, P., Garcia-Montoya, E., Orriols, A., Miñarro, M., Ticó, J. R., Suñe-Negre, J. M. (2005). A new validated method for the simultaneous determination of benzocaine, propylparaben and benzyl alcohol in a bioadhesive gel by HPLC. **J. Pharm. Biomed. Anal.** **39**, 920-927

Pérez, S., Vale, C., Alonso, E., Alfonso, C., Rodríguez, P., Otero, P., Alfonso, A., Vale, P., Hiram, M., Vieytes, M. R., Botana, L. M. (2011). A comparative study of the effect of ciguatoxins on voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels in cerebellar neurons. **Chem. Res. Toxicol.** **24**, 587-596

Planas, M. E., Gonzalez, P., Rodriguez, L., Sanchez, S., Cevc, G. (1992). Noninvasive percutaneous induction of topical analgesia by a new type of drug carrier, and prolongation of local pain insensitivity by anesthetic liposomes. **Anesth. Analg.** **75**, 615-621.

Pinto, L. M. A (2002). **Desenvolvimento de formulações anestésicas locais de longa duração**. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Pinto, L. M., Yokaichiya, D. K., Fraceto, L. F., de Paula, E. (2000). Interaction of benzocaine with model membranes. **Biophys. Chem.** **87**, 213-223.

Pinto, L. M., Fraceto, L. F., Santana, M. H., Pertinhez, T. A., Junior, S. O., de Paula, E. (2005). Physico-chemical characterization of benzocaine-beta-cyclodextrin inclusion complexes. **J. Pharm. Biomed. Anal.** **39**, 956-963.

Potts, R. O., Guy, R. H. (1992) Predicting skin permeability. **Pharm. Res.** **9**, 663–669.

Prista, L. V. N. (1993). **Tecnologia Farmacêutica**. 4.ed.- Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2085-2149.

Proksch, E., Brandner, J. M., Jensen, J-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology.** **17**:63–1072.

Puglia, C., Sarpietro, M. G., Bonina, F., Catelli, F., Zammataro, M., Chiechio, S. (2011). Development, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of benzocaine- and lidocaine-loaded nanostructured lipid carriers. **J. Pharm. Sci.** **100**, 1892-1899

Purdon, C. H., Azzi, C. G., Zhang, J., Smith, E. W., Maibach, H. I. (2004). Penetration Enhancement of Transdermal Delivery- Current Permutations and Limitations. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.** **21**, 97-132.

Raso, S. M., Fernandez, J. B., Beobide, E. A., Landaluce, A. F. (2006). Methemoglobinemia and CNS toxicity after topical application of EMLA to a 4-year-old girl with molluscum contagiosum. **Pediatr Dermatol.** **23**, 592-593.

Ribeiro, H. M., Marcão, R., Barata, E., Gouveia, L., Rodrigues, L., Moraes, J. (1999). Viscosidade por dois tipos de viscosímetros. **Cosmet. Toiletries** **11**, 47-50.

Ruetsch, Y. A., Boni, T., Borgeat, A. (2001). From Cocaine to Ropivacaine: The History of Local Anesthetic Drugs. **Curr. Top. Med. Chem.** **3**, 175-82.

Ruozi. B., Tosi, G., Forni, F., Fresta, M., Vandelli, M. A. (2005). Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. **Eur. J. Pharm. Sci.** **25**, 81-89

Sachdeva, R., Pugeda, J. G., Casale, L. R., Meizlish, J. L., Zarich, S. W. (2003). Benzocaine-Induced Methemoglobinemia- a potentially fatal complication of transesophageal echocardiography. **Inst. J.** **30**, 308-310.

Santana, M. H. A., Zanchetta, B. (2011). Elastic liposomes. In: Beck, R., Guterres, S., Pohlmann, A. **Nanocosmetics and Nanomedicines: New approaches for Skin Care**. 1 ed. German: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Sato, M. E. O., Gomara, F., Pontarolo, R., Andreatza, I. F., Zaroni, M. (2007). Permeação cutânea in vitro do ácido kógico. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** **43**, 195-203

Sawyer, J., Febbraro, S., Masud, S., Ashburn, M. A., Campbell, J. C. (2009). Heated lidocaine/tetracaine patch (Synera, Rapydan) compared with lidocaine/prilocaine cream (EMLA) for topical anaesthesia before vascular access. **Br. J. Anaesth.** **102**, 210-5.

Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., de Cordova C. A., Creczynski-Pasa T.B., Guterres S. (2005). Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. **Int. J. Pharm.** **289**, 209-213.

Schreier, S., Malheiros, S. V. P., de Paula, E. (2000). Surface Active Drugs: Self-association and Interaction with Membranes and Surfactants. Physicochemical and Biological Aspects. **Biochim. Biophys. Acta.** **1508**, 210-234.

Shah, V. P., Elkins, J., Lam, S.Y., Skelly, J. P. (1989). Determination of *in vitro* drug release form hydrocortisone creams. **Int. J. Pharm.** **53**, 53-59.

Shah, V. P., Elkins, J., Williams, R. L. (1999). Evaluation of the test system used for *in vitro* release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharm. Dev. Technol.** **4**, 377-385.

Sharma, B. B., Jan, S. K., Vyas, S. P. (1994). Topical liposome system bering local anesthetic lignocaine: preparation and evaluation. **J. Microencapsul.** **1994**, 279-86

Sharma, S. K., Gajraj, N. M., Sidawi, J. E., Lowe, K. (1996). EMLA cream effectively reduces the pain of spinal needle insertion. **Reg. Anesth.** **21**, 561-564.

Shaw, D. J. (1991). **Introduction to colloid & surface chemistry.** 4th.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann

Sheil, M., Giffard, A., Olsson, C. R. (2006) Composition, useful to treat significant open wound, comprises a local anesthetic agent and a carrier for forming a long-lasting barrier over the open wound and for promoting and prolonging contact of the anesthetic agent with the wound. International Patent Number. WO2006096914-A1.

Shin, S., Lee, J., Yang, K., Lee, C. (2003). Preparation and evaluation of bioadhesive benzocaine gels for enhanced local anesthetic effects. **Int. J. Pharm.** **260**, 77-81

Siewert, M., Dressman, J., Brown, C. K., Shah, V. P. (2003). FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/*in vitro* release testing of Novel/Special dosage forms. **AAPS PharmSciTech.**, **4**, 1-10.

Silva, A. L. R. (2007). **Preparo, caracterização e estudos de estabilidade em pré-formulações de gel de benzocaína lipossomal e não lipossomal para uso tópico em odontologia.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

Silva, A. L. R., Franz-Montan, M., Groppo, F. C., Volpato, M. C., Ranali, J., Fraceto, L. F., de Paula, E. (2008). **Pharmaceutical composition comprising a local anaesthetic and a carboxyvinyl polymer**. Patent number # WO/2008/138089.

Singh, R., Vyas, S. P. (1996). Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery. **J. Dermatol. Sci.** **13**, 107-111.

Smith, G. G., Kennedy, D. R., Nairn, J. G. (2006). Hydrolysis kinetics of benzocaine and homologs in the presence of a nonionic surfactant. **J. Pharm. Sci.** **63**. 712-716

Sinico, C., Fadda, A. M. (2009). Vesicular carriers for dermal drug delivery. **Expert. Opin. Drug Deliv.** **6**, 813, 825

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.

Strichartz, G. R. (1987). **Local anesthetics**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Strichartz, G.R., Sanchez, V., Arthue, R., Chafetz, R. & Martin, D. (1990) Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficient and pKa values of clinically used drugs **Anesth. Analg.** **71**, 158-170.

Sztark, F., Ouhabi, R., Dabadie, P., Mazat, J.P. (1997). Effects of the local anesthetic bupivacaine on mitochondrial energy metabolism: change from uncoupling to decoupling depending on the respiration state. **Biochem. Mol. Biol. Int.** **43**, 997–1003.

Taddio, A., Soin, H. K., Schuh, S., Koren, G., Scolnik, D. (2005). Liposomal lidocaine to improve procedural success rates and reduce procedural pain among children: a randomized controlled trial. **C. M. A. J.** **172**, 1691–1695.

Tadicherla, S., Berman, B. (2006). Percutaneous dermal drug delivery for local pain control. **Ther. Clin. Risk. Manag.** **2**, 99-113.

Tanner, T., Marks, R. (2008). Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. **Skin Res. Technol.** **14**, 249–260.

Torchilin, V. P., Weissig, V. (2003). **Liposomes: a practical approach**. 2 ed. New York: Oxford University Press. 149-151.

Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nat. Rev. Drug Discov.** **4**, 145-160.

Touma, S., Jackson, J. B. (2001). Lidocaine and prilocaine toxicity in a patient receiving treatment for mollusca contagiosa. **Am. Acad. Dermatol.** **44**, 399-400.

Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., Eliaz, M. (2000). Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. **J. Control. Release** **65**, 403-418.

Touitou, E., Levi-Schaffe, F., Dayan, N., Alhaique, F., Ricciari, F. (1994). Modulation of caffeine skin delivery by carrier design: Liposomes versus permeation enhancers. **Int. J. Pharm.** **103**, 131-136.

Uchino, T., Lefeber, F., Gooris, G., Bouwstra, J. (2011). Physicochemical characterization of drug-loaded rigid and elastic vesicles. **Int. J. Pharm.** **412**, 142-147.

United States Pharmacopeia. (2010). 33.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention.

Van den Bergh, B. A., Bouwstra, J. A., Junginger, H. E., Wertz, P. W. (1999a). Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability. **J. Control. Release.** **62**, 367-379.

Van den Bergh, B. A., Vroom, J. Gerritsen, H., Junginger, H. E., Bouwstra, J. A., (1999b). Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: electron microscopy and two-photon excitation microscopy. **Biochim. Biophys. Acta.** **1461**, 155-173

Yagle, P. L. (2005). **The structure of biological membranes**. 2 ed. Florida: CRC Press LLC.

Zancheta, B. (2009). **Desenvolvimento de um sistema nanoestruturado CH8/EPC/PEG para o tratamento da Leishmaniose cutânea**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Processos Tecnológicos, Universidade Estadual de Campinas.

Welder, A. A. (1992). A primary culture system of adult rat heart cells for the evaluation of cocaine toxicity. **Toxicology**. **72**, 175-187.

Williams, A. C., Barry, B.W. (2004). Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews** **56**: 603–618.