

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

JOSÉ LAUFER NETO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, DE ABSORÇÃO
PERCUTÂNEA E DE BIOCOMPATIBILIDADE DE GEL ANESTÉSICO
TERMOSENSÍVEL**

PONTA GROSSA
2006

JOSÉ LAUFER NETO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, DE ABSORÇÃO
PERCUTÂNEA E DE BIOCOMPATIBILIDADE DE GEL ANESTÉSICO
TERMOSENSÍVEL**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: **Profº. Dr. Fábio André dos Santos**

PONTA GROSSA
2006

L373a Laufer Neto, José
Avaliação das propriedades físico-químicas, de absorção
percutânea e de biocompatibilidade de gel anestésico
termosensível. / José Laufer Neto. Ponta Grossa, 2005.
134 f.; il.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Estadual de
Ponta Grossa, curso de Mestrado em Odontologia – área de
concentração em Clínica Integrada.
Orientador: Prof. Dr. Fabio André dos Santos

1- Lidocaína 2-Prilocaína 3-Anestésicos tópicos. I.T.

CDD: 617.6

JOSÉ LAUFER NETO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, DE ABSORÇÃO
PERCUTÂNEA E DE BIOCOMPATIBILIDADE DE GEL ANESTÉSICO
TERMOSENSÍVEL**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de 2006



Prof. Dr. Fábio André dos Santos – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dra. Cristiane Aparecida de Oliveira
Uningá

DADOS CURRICULARES

José Laufer Neto

NASCIMENTO	18.05.1978	Curitiba – Brasil
FILIAÇÃO		Maria Célia Laufer Celso Luiz Laufer
	1996/2000	Curso de Graduação em Odontologia. Universidade Federal do Paraná – Curitiba – Brasil.
	2000-2000	Curso de Aperfeiçoamento em Periodontia e Cirurgia Oral Menor. Associação Brasileira de Odontologia, Regional de Curitiba – ABO/PR, Curitiba, Brasil
	2001/2002	Curso de Especialização em Periodontia. Associação Brasileira de Odontologia, Regional de Ponta Grossa – ABO/PR, Ponta Grossa, Brasil
	2004/2006	Curso de Pós-graduação em Odontologia Área de Concentração - Clínica Integrada, Nível Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

RESUMO

A anestesia não invasiva com a aplicação de gel anestésico no interior da bolsa periodontal surge como uma alternativa no tratamento periodontal. Esse estudo teve como objetivo manipular, testar as propriedades físico-químicas, de absorção percutânea de um gel anestésico tópico termosensível (lidocaína/prilocaína 5% - Teste) e avaliar a sua biocompatibilidade. Foram realizados estudos de pré-formulação, microbiológicos e absorção percutânea (AP) in vitro e in vivo do fármaco. Para biocompatibilidade foram utilizadas 2 técnicas: permeabilidade vascular (PV) e análise histológica descritiva (AH). Na PV foram utilizados 60 ratos e 3 períodos de observação (3, 6, 9 horas) em que avaliou-se a área da inflamação visualmente e por quantificação do corante aplicado sob análise de espectrofotometria após implantação de 0,1 mL das substâncias sendo: G1-Teste; G2-EMLA®; G3-Poloxamer; G4-Controle. Na AH foram utilizados 60 ratos divididos em 4 grupos (os mesmos supra citados) com implantação subcutânea de tubos de polietileno preenchidos com as substâncias, em períodos de 2, 5 e 15 dias. Os resultados de farmacotécnica mostraram valores de pH=7,71, densidade (ρ_{gel} =1,020), não ocorrendo crescimento microbiano (gram+, gram- e fungos) na substância Teste e mostrando uma boa viscosidade, adequada para uso em cavidade bucal. A AP não mostrou diferenças significativas entre o G1 e G2 com $p > 0,05$ (Mann-Whitney) para os experimentos in vitro e in vivo. Na PV G1 e G2 tiveram valores maiores ($p < 0,05$) que G3 e G4. A análise histológica não mostrou áreas de necrose, nem resposta inflamatória severa. Conclui-se que o gel Teste apresenta propriedades adequadas e mostrou não induzir resposta inflamatória severa no subcutâneo de ratos, mostrando-se biocompatível quando comparado com o grupo controle.

Palavras – chaves: Lidocaína; Prilocaína; Anestésicos Tópicos.

ABSTRACT

The no invasive anesthesia by application of an anesthetic gel in the interior of the periodontal pocket appears as an alternative in the periodontal treatment. The objective of this study was to manipulate, to test the physical-chemical properties, the percutaneous absorption of a gel thermosetting topical anesthetic (lidocaine/prilocaine 5% - Test) and evaluates its biocompatibility. Pre – formulation studies, microbiological and percutaneous absorption (PA) in vitro and in vivo, has been done. To evaluate aspects of biocompatibility 2 techniques had been done: vascular permeability (VP) and descriptive histological analyses (HA). In the PV, 60 rats and 3 periods of observation had been used (3, 6, 9 hours) and were evaluated, visually, for the area of the inflammation and for dye concentration applied, by spectrophotometric analysis, after implantation of 0,1 mL of the substances: G1-Teste; G2-Emla®; G3-Poloxamer; G4-Controle. In AH, 60 rats, were divided in 4 groups (in the same way cited before) with subcutaneous implantation of polyethylene tubes with substances had been used, in periods of 2, 5 and 15 days. The pharmacotechnical results had shown values of pH=7,71, density (ρ_{gel} =1,020), not occurring microorganisms growth (gram+, gram- and fungi) in the substance Test and showing a good viscosity, adjusted for use in oral cavity. AP did not show significant differences between the GI and GII, with $p>0,05$ (Mann-Whitney) for the experiments in vitro and in vivo. In the PV, G1 and G2 had bigger values ($p<0,05$) than G3 and G4. The histological analysis did not show areas of necrosis, nor severe inflammatory response. It is concluded that the gel Test presents adequate properties and showed not to induce severe inflammatory response in the subcutaneous, showing biocompatibility when compared with the control group.

Word keys: Lidocaine; Prilocaine; Topical anesthetics.

DEDICATÓRIA

A **Deus**, que tantas vezes olhou por mim em momentos difíceis e me reconfortou diante deles, obrigado pela oportunidade de estar aqui hoje e por tudo que me tens concedido.

Aos meus pais **Celso e Maria Célia**, que mais uma vez acreditaram em minha capacidade e me ajudaram a escalar mais um degrau da minha vida acadêmica. Obrigado por compreenderem minha ausência em momentos importantes de nossas vidas, pela paciência mostrada dia a dia, pela confiança, pelo incentivo e por serem sempre meu maior exemplo de vida. Sem dúvida esse trabalho pertence mais a vocês que a mim. Amo vocês mais que tudo!

Aos meus irmãos, **Juliana e Gustavo**, que mesmo estando longe de casa nesse momento, sei que torcem por mim. Adoro vocês!

A minha família..... Especialmente as minhas avós, **Ondina e Júlia** pelo carinho e pelos almoços nos finais de semana em Curitiba. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Profº. Dr. Fábio André dos Santos**, pelos conhecimentos transmitidos, transparência, paciência e amizade. Você é uma das pessoas em quem eu me espelho para continuar a jornada pela vida acadêmica. Obrigado por me ensinar a gostar da pesquisa e conseguir entender um pouco de como ela é feita. Sua dedicação e postura são exemplos que todos deveriam seguir. Tenha certeza que sem sua ajuda essas páginas não estariam sendo escritas.

Aos professores **Drª. Jocélia Lago Jansen** e **Ms. Paulo Vitor Farago**, duas grandes estrelas que me ajudaram a iluminar os caminhos dessa dissertação. Sem vocês nada disso teria acontecido. Obrigado pela confiança, pelos conselhos e conhecimentos transmitidos em Farmacologia. Sua amizade nunca será esquecida. Guardo vocês em meu coração.

Ao **Profº. Dr. Gibson Luiz Pilatti**, pelo apoio e pelas idéias sempre pertinentes que colaboraram para o sucesso desse trabalho.

Aos meus “Tios” **Rui e Célia** por terem cedido seu apartamento durante o período do mestrado. Ele me lembrará de momentos inesquecíveis....
À vocês minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, na pessoa de seu reitor **Paulo Roberto Godoy** e vice-reitor **Ítalo Sergio Grande** pela oportunidade outorgada.

À **Fundação Araucária** – Paraná e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de ensino Superior – **CAPES** pela presteza e dedicação ao fomento da pesquisa.

Aos professores do curso do mestrado **Abraham Lincoln Calixto**, **Antonio Edgar Krölling**, **Benjamin de Melo Carvalho**, **Carlos Roberto Berger**, **Denise Stadler Wambier**, **Elizabete Brasil dos Santos**, **Gislaine Czlusniak**, **Joane Augusto Souza Junior**, **Jorim Souza das Virgens Filho**, **Leide Mara Schmidt**, **Stella Kossatz Pereira**, **Ulisses Coelho**, **Vitoldo Kozlowski Júnior**.

Às bibliotecárias **Ângela** e **Vera**, pela ajuda na procura de artigos científicos e revisão metodológica desta dissertação.

À companhia **Basf** e a **Nortec do Brasil**, pela doação dos materiais utilizados no desenvolvimento da parte experimental da dissertação.

À Universidade Federal do Paraná – **UFPR**, por permitir a utilização de parte dos aparelhos usados nessa pesquisa.

Ao **Boticário** por permitir o uso do aparelho para medição da absorção percutânea total. A equipe que me auxiliou, Angela e Marina, meu muito obrigado.

Ao departamento de Química da Universidade estadual de Ponta Grossa – **UEPG**, por permitir a utilização do aparelho de espectrofotometria de ultra violeta. Aos professores **Jesuan** e **Paulo Borba** meu muito obrigado.

Ao **Profº. Dr. João Carlos Gomes**, pelos esforços para elaboração e manutenção de um curso de mestrado com qualidade. Pela exemplar dedicação à Universidade Estadual de ponta Grossa. Pelos conselhos e compreensão em momentos importantes durante o curso de mestrado. Fico grato e orgulhoso de ter sua confiança. Obrigado!

A **Profª. Drª. Osnara Maria Mongruel Gomes**, pelo conhecimento transmitido não só em caráter científico, mas também em lições de vida. Obrigado por emprestar seu precioso tempo nas correções da dissertação e dos artigos. A senhora sempre será lembrada.

A **Profª. Drª. Josélia Borba Daher** que gentilmente cedeu a utilização do biotério para a realização das pesquisas dessa dissertação. Obrigado pelo carinho. Sua contribuição para o trabalho será lembrada sempre.

À **Morgana das Graças Procz dos Santos**, pela amizade acima de tudo, mas também, pela paciência, disposição, competência e por ter sempre uma palavra amiga em momentos de dúvida. Serei eternamente grato.

As queridas e atenciosas funcionárias dos laboratórios pelos quais passei em especial para **Maria Inês Cordeiro**, pelos momentos que passamos juntos no laboratório de histologia e **Mira**, que me ajudou em vários momentos na Farmacotécnica. Sem esquecer claro, das funcionárias do Biotério da UEPG. **Mari** você sempre vai morar no meu coração. Obrigado pela ajuda no manuseio dos ratos e pelas conversas que fez o tempo passar muito rápido durante a realização da pesquisa. **Bete**, que me ajudou tanto no biotério quanto na farmacotécnica, meu muito obrigado. E a todas as outras pessoas e funcionários que me auxiliaram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao pessoal das duas repúblicas as quais me considero membro efetivo. A de Curitiba – **República do edifício Caiomar: Leonardo, Rodrigo e Aladim** – obrigado pelo carinho e desestresse nos finais de semana. A de Ponta Grossa – **Dioguinho, Kiko e Akira, Polaco e Marcelo** – obrigado por momentos inesquecíveis que passamos juntos.

À minha companheira do laboratório de Cosmetologia, **Vivi Poli**, se não fosse por você tudo teria sido mais difícil. Obrigado pelas conversas e pela cumplicidade em momentos difíceis.

Finalmente aos meus companheiros de mestrado: **Carolina Oberg Sartori, Fernanda Zander Grande, João Luiz Neves Pereira, José David Juan**

Antures, Julianna Cristina de Souza, Márcia Cristina Rastelli, Marissol Maria de Oliveira Vasconcellos Romanelli, Patrícia Grau Grullon, Priscila Paiva Portero, Rafael Ditterich, Ricardo Kern, Sandra Cristina Sgarbi Daniel, Veridiana Camilotti. De cada um guardo muitas lembranças, e falar de cada uma delas fica difícil e faltariam páginas. Obrigado a todos!

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. MUITO OBRIGADO!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química da lidocaína	27
Figura 2	Estrutura química da prilocaína	28
Figura 3	Estrutura química do poloxamer	31
Figura 4	Fórmula do coeficiente de partilha	36
Quadro 1	Divisão dos grupos de estudo para os testes de avaliação de biocompatibilidade	58
Prancha 1 – A	Transferência dos pós para o béquer	68
Prancha 1 – B	Complementação com água destilada q.s.p	68
Prancha 1 – C	Homogeneização da amostra	68
Prancha 1 – D	Proteção com filme plástico	68
Prancha 2 – A	Esquema da demarcação da área de trabalho (1 cm ²)	69
Prancha 2 – B	Esquema da aplicação do Gel Teste na área de trabalho	69
Prancha 2 – C	Esquema da aplicação da fita adesiva sobre a área de trabalho	69
Prancha 2 – D	Visualização das células de estrato córneo aderidas na fita adesiva após a remoção da mesma	69
Prancha 2 – E	Visualização da área de trabalho em mucosa bucal	69
Prancha 3 – A	Aplicação do corante Azul de Evans pela veia lateral caudal do animal	70
Prancha 3 – B	Aplicação das substâncias participantes do estudo no tecido subcutâneo do animal, com auxílio de seringa de insulina de 1 mL	70
Prancha 3 – C	Visão do tecido biopsiado contendo os halos azulados formados pelo extravasamento do corante	70

Prancha 4 – A	Incisão na linha sagital mediana.....	71
Prancha 4 – B	Colocação das substâncias testadas no interior dos tubos de polietileno de modo a não se observar bolhas em seu interior	71
Prancha 4 – C	Colocação dos tubos no tecido subcutâneo dos Animais.....	71
Prancha 4 – D	Sutura da região dorsal do animal.....	71
Prancha 5 – A	Esquema ilustrativo da posição do tubo de polietileno em relação ao bloco de parafina (perpendicular ao corte) e movimento de corte do micrótomo manual	72
Prancha 5 – B	Cortes histológicos incluídos no estudo (sem a presença de vestígios do tubo de polietileno)	72
Prancha 5 – C	Corte histológico descartado do estudo (com a presença do tubo de polietileno).....	72
Prancha 6 – A	Curvas de calibração para a lidocaína (em rosa) e prilocaína (em azul), em comprimento de onda (λ) de 220 nm e 240 nm, respectivamente	85
Prancha 6 – B e C	Curva dos valores de absorção em mol/L de lidocaína (em azul) e prilocaína (em rosa) após a aplicação do Gel Teste (B) e EMLA® (C) sobre a pele. Diferenças não significativas entre os grupos I “versus” II para Lidocaína e Prilocaína (respectivamente $p= 0,644$ e $p= 0,364$). Teste t não pareado – $P>0,05$	85
Prancha 7 – A	Gráfico dos valores das porcentagens acumuladas para a lidocaína e prilocaína nos grupos I e II. Lidocaína (GI)= 72,93/ (GII)= 63,89. Prilocaína (GI)= 72,57/ (GII)= 61,71	86
Prancha 7 – B	Gráfico dos valores das porcentagens acumuladas para os grupos I e II pelo método de células de difusão. GI = 21,60/ GII = 21,90	86
Prancha 8 – A	Curva de calibração para a mistura eutética de lidocaína e prilocaína.....	87
Prancha 8 – B	Curva dos valores de absorção para a mistura eutética de lidocaína e prilocaína após aplicação do Gel Teste em decorrência do tempo (minutos)..	87

Prancha 8 – C	Curva dos valores de absorção para a mistura eutética de lidocaína e prilocaína após aplicação do EMLA® em decorrência do tempo (minutos).....	87
Prancha 9 – A	Gráfico dos valores obtidos, em porcentagem acumulada de dose aplicada, após a aplicação do Gel Teste e EMLA®, pelo período de 1 minuto, em mucosa bucal. Lidocaína (GI) = 6,37/ (GII) = 6,91. Prilocaína (GI) = 5,08/ (GII) = 6,18	88
Prancha 10 – A	Avaliação da permeabilidade vascular através da mensuração do extravasamento do vascular do azul de Evans (Média e Erro Padrão).....	89
Prancha 10 – B	Avaliação da permeabilidade vascular através da concentração de azul de Evans (Média e Erro Padrão)	89
Prancha 11 – A	Relação entre as medições dos halos (mm ²) com a concentração de azul de Evans no tecido ...	90
Prancha 12 – A	Corte histológico do grupo Controle 2 dias – HE – 100x	91
Prancha 12 – B	Corte histológico do grupo Poloxamer 2 dias – HE – 100x	91
Prancha 12 – C	Corte histológico do grupo EMLA 2 dias – HE – 100x	92
Prancha 12 – D	Corte histológico do grupo Teste 2 dias – HE – 100 x	92
Prancha 13 – A	Corte histológico do grupo Controle 5 dias – HE – 100x	93
Prancha 13 – B	Corte histológico do grupo Poloxamer 5 dias – HE – 100x	93
Prancha 13 – C	Corte histológico do grupo EMLA 5 dias – HE – 100x	94
Prancha 13 – D	Corte histológico do grupo Teste 5 dias – HE – 100 x	94
Prancha 14 – A	Corte histológico do grupo Controle 15 dias – HE – 100x	95

Prancha 14 – B	Corte histológico do grupo Poloxamer 15 dias – HE – 100x	95
Prancha 14 – C	Corte histológico do grupo EMLA 15 dias – HE – 100x	96
Prancha 14 – D	Corte histológico do grupo Teste 15 dias – HE – 100 x	96
Prancha 15 – A	Frequência de escores para o período de observação de 2 dias. Não significativo ($p = 0,124$)	97
Prancha 15 – B	Frequência de escores para o período de observação de 5 dias. Não significativo ($p = 0,214$)	97
Prancha 15 – C	Frequência de escores para o período de observação de 15 dias. “versus” TESTE, POLOXAMER e CONTROLE. “versus” CONTROLE ($p = 0,032$)	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulação do gel base de Poloxamer 407 e 188.....	44
Tabela 2	Formulação do gel a base de lidocaína e prilocaína não-ionizadas.....	44
Tabela 3	Análises físico-químicas para o Gel teste e Gel Poloxamer. Média dos valores em triplicata.....	73
Tabela 4	Análise da viscosidade para o Gel Teste e Gel Poloxamer. Médias dos valores em triplicata	75
Tabela 5	Valores dos testes para determinação do coeficiente de partilha das substâncias ativas (lidocaína e prilocaína).....	75
Tabela 6	Parâmetros analíticos para a elaboração da curva de calibração da lidocaína	75
Tabela 7	Parâmetros analíticos para a elaboração da curva de calibração da prilocaína	76
Tabela 8	Parâmetros analíticos para a elaboração da curva de calibração da mistura eutética de lidocaína e prilocaína	77
Tabela 9	Médias e o desvio padrão (DP) da área de extravasamento, em mm ² , do corante Azul de Evans na região subcutânea dorsal dos ratos, para cada grupo experimental, substâncias e tempos	79
Tabela 10	Médias e o desvio padrão (DP) da medição da quantidade do corante extravasado, em µg/mL, na região subcutânea dorsal dos ratos, para cada grupo experimental, substâncias e tempos	80
Tabela 11	Análise descritiva (2 dias)	83
Tabela 12	Análise descritiva (5 dias)	83
Tabela 13	Análise descritiva (15 dias)	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.D.A.	<i>American Dental Association</i>
AL	Anestésicos locais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPITN	<i>Community Periodontal Index of Treatment Needs</i>
cm ²	centímetro quadrado
EC	Estrato córneo
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EDTA	ácido etilenediaminetetraacético
EGTA	ácido eitlenoglicotetraacético
EMLA	Eutetic mixture of Local Anesthetics
F.D.A.	<i>Foods and Drugs Administration</i>
g	grama
LTA	ácido lipoteicóico
H.E.	Hematoxilina e eosina
mg/g	miligrama por grama
mg/mg	miligrama por miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
nm	nanograma
NaCl	Cloreto de Sódio
OECD	<i>Organisation for Economic Co-Operation and Development</i>
P.A.	pura
pH	potencial de hidrogênio iônico
pKa	constante ácida de dissociação
RPM	rotações por minuto
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
µm	micrograma
%	porcentagem
°C	graus Celsius
±	mais ou menos
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO FARMACOTÉCNICA (DELINEAMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS).....	32
2.2	ESTUDOS EM ANIMAIS	41
2.2.1	Análise da permeabilidade vascular	42
2.2.2	Análise histológica.....	43
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	DELINEAMENTO DAS FORMAS FARMACÊUTICAS	46
4.1.1	Manipulação das formulações anestésicas tópicas termosensíveis	46
4.1.1.1	Manipulação do veículo para o gel Teste (Gel Poloxamer)	46
4.1.1.2	Manipulação do gel teste.....	47
4.1.2	Controle de qualidade das formas farmacêuticas	48
4.1.2.1	Determinação dos valores de pH	48
4.1.2.2	Determinação da densidade relativa	49
4.1.2.3	Determinação da consistência das formulações	49
4.1.2.4	Estudo microbiológico	50
4.1.3	Determinação do coeficiente de partilha	51
4.1.4	Absorção percutânea	52
4.1.4.1	Estudos in vitro	54
4.1.4.1.1	Método do “Tape Stripping”	54
4.1.4.1.2	Avaliação da absorção percutânea em células de difusão in vitro.....	56
4.1.4.2	Estudos in vivo	58

4.2	AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE	60
4.2.1	Análise da permeabilidade vascular	61
4.2.2	Análise histológica.....	63
4.3	DELINEAMENTO ESTATÍSTICO.....	66
4.3.1	Delineamento de fórmulas farmacêuticas	66
4.3.2	Absorção percutânea	66
4.3.3	Permeabilidade vascular	66
4.3.4	Análise Histológica	67
5	RESULTADOS.....	73
5.1	CONTROLE DE QUALIDADE DAS FORMAS FARMACÊUTICAS.....	73
5.2	ESTUDOS DO COEFICIENTE DE PARTILHA	74
5.3	ESTUDO DA ABSORÇÃO PERCUTÂNEA.....	75
5.3.1	Estudos in Vitro	75
5.3.1.1	Método do “Tape Stripping”	75
5.3.1.2	Células de difusão	77
5.3.2	Estudos in Vivo.....	78
5.4	AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE	79
5.4.1	Estudo da permeabilidade vascular.....	79
5.4.2	Análise Histológica	81
6	DISCUSSÃO	98
7	CONCLUSÃO	116
	REFERÊNCIAS	117
	APÊNDICE A – Gráfico 1	124
	APÊNDICE B - Tabelas 14 a 28	126
	ANEXO A – Aprovação do projeto de pesquisa intitulado Análise da Absorção Percutânea (mucosa) de Gel e Creme anestésico local pelo Método de Tape Stripping”	132

1 INTRODUÇÃO

O tratamento não – cirúrgico para a doença periodontal envolve etapas imprescindíveis para a obtenção de um sucesso clínico no tratamento da doença periodontal, tais como, a orientação de higiene bucal, remoção de fatores de retenção e as instrumentações supra e subgengival, sendo estas técnicas que, para um melhor conforto e segurança, tanto do profissional quanto do paciente, envolvem o uso de técnicas de anestesia local.

Segundo Goodell; Gallagher e Nicoll (2000) e Saloum et al. (2000), o medo da anestesia local é comumente descrita pelos pacientes na clínica odontológica. A sensibilidade dolorosa sentida pela inserção da agulha, a duração de sua ação e o inconveniente da anestesia dos tecidos moles pode influenciar a aceitação dessa técnica pelo paciente (DONALDSON et al., 2003).

Os anestésicos tópicos em forma de creme foram desenvolvidos para contornar essas dificuldades e vem sendo usados na cavidade bucal com resultados satisfatórios. Munshi; Hegde e Latha (2001) mencionam que o creme anestésico dermatológico a base de lidocaína e prilocaína (EMLA[®] - *Eutetic Mixture of Local Anesthetics*) pode ser usado como terapia alternativa de anestesia local, substituindo a técnica convencional com inserção de agulhas, principalmente na dentística em Odontopediatria. Mcmillan; Walshaw e Meechan (2000) relatam que esse anestésico tópico é mais efetivo que a lidocaína injetável, bem como citam que possui um tempo de ação curto, propício para realização de cirurgias em mucosas. Donaldson e Meechan (1995) sugerem que o EMLA[®] pode ser de grande ajuda para a anestesia em procedimentos periodontais não-cirúrgicos, quando o tecido gengival precisa ser manipulado.

Vickers et al. (1997) relatam que em 75% dos indivíduos participantes do estudo, o qual envolveu a avaliação da dor em procedimentos restauradores, o creme promoveu anestesia satisfatória.

A anestesia não-invasiva, com a aplicação de gel anestésico no interior da bolsa periodontal, surge como uma alternativa no tratamento periodontal não-cirúrgico. Um novo anestésico em gel, a base de lidocaína (25 mg/g) e prilocaína (25 mg/g) - Oraquix[®] - foi desenvolvido para fornecer um melhor controle da dor em técnicas de instrumentação subgingival, sendo utilizado de maneira não-invasiva dentro do sulco/bolsa periodontal (DENTSPLY, 2005). O gel consiste num sistema termosensível que permanece como um fluido de baixa viscosidade à temperatura ambiente, porém transformando-se em um gel elástico no contato com a temperatura corporal. (FRISKOPP; NILSSON; ISACSSON, 2001; MAGNUSSON et al., 2003).

O objetivo de Donaldson et al. (2003) foi determinar a eficácia anestésica de um gel termosensível (Oraquix[®]) mediante comparação com um gel placebo para o tratamento não-cirúrgico da doença periodontal, concluindo que o gel teste mostrou ser mais efetivo que o gel placebo na redução da sensibilidade dolorosa durante a instrumentação periodontal, principalmente quando relacionadas a bolsas profundas e a um maior índice de sangramento.

van Steenberghe et al. (2004) avaliaram a preferência dos pacientes utilizando, para o tratamento não – cirúrgico da doença periodontal, dois tipos de técnicas anestésicas, uma com anestesia injetável (lidocaína 2% com adrenalina) e com um gel anestésico termosensível (lidocaína 25mg/g e prilocaína 25mg/g – Oraquix[®]). A aplicação do gel anestésico de maneira subgingival ofereceu vantagens em relação à anestesia convencional, de acordo com o ponto de vista dos

pacientes, mesmo que uma minoria deles tenha necessitado de complementação anestésica injetável para o adequado controle da dor.

Evidencia-se, portanto, a necessidade de se desenvolver uma técnica anestésica que seja de mais rápida ação, de simples aplicação e que seja indolor, proporcionando maior conforto para o paciente e segurança para o profissional. Para que isso seja possível faz-se necessário que existam substâncias e técnicas anestésicas que possam suprir esses objetivos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

No último levantamento epidemiológico em saúde bucal, de 1986, que utilizou o “Community Periodontal Index of Treatment Needs” (CPITN) para a obtenção de dados sobre a doença periodontal no Brasil, foi relatado que 5,2% e 7,4% da população entre 35/44 anos e 50/59 anos, respectivamente, tinham um ou mais dentes com profundidade de sondagem maior ou igual a 5,5 mm (BRASIL, 1988). Os resultados do estudo de Susin et al. (2004) mostraram que a perda de tecido de inserção e, conseqüentemente, a existência da doença periodontal, é bastante prevalente na população urbana adulta. Aproximadamente três, de cada quatro indivíduos com idade superior a 30 anos, apresentava pelo menos um elemento dentário com perda de inserção clínica maior ou igual a 5 mm, e mais da metade dos sujeitos participantes da pesquisa, possuíam um ou mais dentes com perda de inserção clínica maior ou igual a 7 mm.

Para eliminar ou controlar a doença periodontal, devido a sua extensão e severidade, que pode variar de acordo com o paciente, se faz necessárias várias sessões para instrumentação subgengival, técnica mais comumente usada para esse tratamento, segundo Pihlstrom et al. (1999) até que se garanta a descontaminação de todas as regiões infectadas na cavidade bucal. A grande maioria dos procedimentos que envolvem o tratamento da doença periodontal, implicam no uso de algum tipo de procedimento anestésico local para o controle da sensibilidade dolorosa. De uma maneira geral, o número de bolsas periodontais e o grau de severidade da doença em um paciente podem variar, influenciando diretamente no volume e no número de intervenções anestésicas, quando do tratamento. (CARR; HORTON, 2001; FRISKOPP; NILSSON; ISACSSON,

2001; JEFFCOAT et al., 2001; DONALDSON et al., 2003; MAGNUSSON et al., 2003; PERRY; GANSKY; LOOMER, 2005).

Segundo Regatieri (2005) são diversas as técnicas de utilização de anestesia local (AL). A anestesia local infiltrativa, também chamada de anestesia periférica ou terminal, ocorre quando infiltramos diretamente o tecido que vai ser operado, sem visar o bloqueio de um nervo ou plexo ou da medula espinal. Nas diferentes técnicas de anestesia regional, utilizamos AL para bloquear nervos (bloqueio de um nervo ou troncular) ou plexos (plexo braquial por via axilar) ou a medula espinal (à nível do neuro eixo como as anestésias peridural e a raquidiana).

Dentre as técnicas para o controle da dor durante os procedimentos de instrumentação periodontal não-cirúrgico, utilizam-se, mais comumente, as anestésias infiltrativas ou de bloqueio regional, associadas ou não ao uso de algum método auxiliar, como por exemplo, os anestésicos de origem tópica (JEFFCOAT et al., 2001; FRISKOPP; NILSSON; ISACSSON, 2001; DONALDSON et al., 2003; MAGNUSSON et al., 2003). Entre os vários sais anestésicos usados para o bloqueio da sensibilidade dolorosa, durante os procedimentos terapêuticos, estão os anestésicos do tipo amida, como, por exemplo, a lidocaína e a prilocaína (SHIN; CHO; YANG, 2004) e os anestésicos do tipo éster, como a procaína e a propoxicaína (MALAMED, 2005).

Os anestésicos locais (AL) são fármacos que bloqueiam reversivelmente a condução do impulso nervoso, entre eles, aqueles envolvidos com estímulos nociceptivos, promovendo anestesia local com intensidade que, muitas vezes, permite a dispensa do uso de anestésicos gerais (ARAUJO; AMARAL, 2004; PIPA VALLEJO; GARCIA-POLA VALLEJO, 2004; MALAMED, 2005; REGATIERI, 2005)

De uma maneira geral, relata-se que seu mecanismo de ação está ligado ao bloqueio dos canais de sódio, impedindo a despolarização neuronal, mantendo a célula em estado de repouso, atuando na paralisação das terminações nervosas sensitivas periféricas (REGATIERI, 2005). Geralmente, os princípios ativos de lidocaína e prilocaína têm sido utilizados em sua forma ionizada (cloridrato) para realização de anestesia local (ROBERTS; SOWRAY, 1995; VASCONCELOS et al., 2002; MALAMED, 2005)

A lidocaína, foi sintetizada no ano de 1943 pelo farmacêutico sueco Nils Löfgren e, cinco anos mais tarde, foi o primeiro anestésico local do tipo amida a ser comercializado (ROBERTS; SOWRAY, 1995; VASCONCELOS et al., 2002; PIPA VALLEJO; GARCIA-POLA VALLEJO, 2004; MALAMED, 2005).

Sua introdução na prática clínica, como a droga de escolha para o controle da dor, transformou a odontologia ao substituir a procaína, único anestésico local até então utilizado pela comunidade odontológica (MALAMED, 2005). Comparada à procaína, a lidocaína tem um início de ação significativamente mais rápido, produzindo anestesia mais profunda, com maior duração e maior potência. Segundo Malamed (2005), Vasconcelos et al. (2002) e Araújo e Amaral (2004) a alergia a anestésicos locais do tipo amida é praticamente inexistente. Essa é a principal vantagem clínica da lidocaína (e de todas as amidas, incluindo-se a prilocaína) sobre os anestésicos locais do tipo éster.

A lidocaína (Figura 01) é quimicamente designada como 2-dietilamina-N-2,6-dimetilfenil-acetamida e tem uma partição de óleo em água em uma taxa de 43 em pH 7,4. O pKa da lidocaína é de 7,86 (DENTSPLY, 2005). É metabolizada pelo fígado, por oxidases microsossomiais, e oxidada em monoetilglicerina e xilidida. Sua excreção é realizada pelos rins, com menos de 10%

de sua forma inalterada e mais de 80% na forma de vários metabólitos. Possui propriedades vasodilatadoras, em concentrações usadas na odontologia, com meia-vida de aproximadamente 90 minutos (MALAMED, 2005).

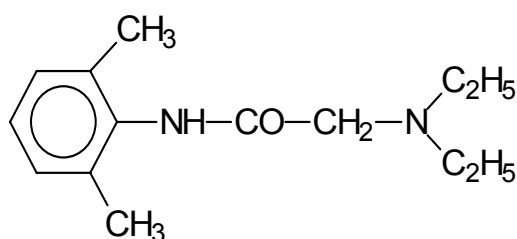


Figura 1 – Estrutura química da lidocaína

A prilocaína (Figura 02) é quimicamente designada como N-2-metil-fenil-2-propilamino-propanamida, tem uma partição de óleo em água em uma taxa de 25 em pH de 7,4, pKa de 7,89 (DENTSPLY, 2005) e foi desenvolvida em 1953 por Löfgren e Tegnér, porém só foi descrita em 1960 e comercializada em 1965, após aprovação da *Foods and Drugs Administration* (FDA) americana (ROBERTS; SOWRAY, 1995; VASCONCELOS et al., 2002; MALAMED, 2005). Difere de maneira significativa da lidocaína, sendo uma amina secundária. É hidrolisada diretamente pelas amidases hepáticas em ortotoluidina e N-propilalanina. O dióxido de carbono é o seu principal produto final da biotransformação. A eficiência da degradação da prilocaína pelo organismo é demonstrada pela fração extremamente pequena do fármaco recuperada intacta na urina. Por ser melhor metabolizada pelos rins, sua remoção da corrente sanguínea é mais rápida quando comparada com a lidocaína. Assim como a lidocaína, também tem propriedades vasodilatadoras em concentrações usadas em odontologia, e uma meia-vida aproximada de 90 minutos (MALAMED, 2005).

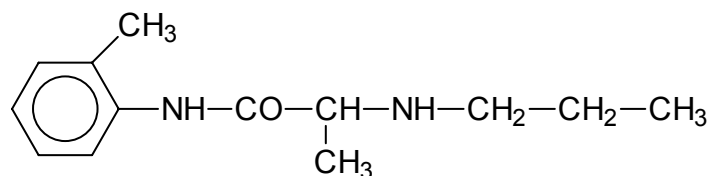


Figura 2 – Estrutura química da prilocaína

A comunidade odontológica tem utilizado esses sais principalmente sob sua forma injetável, mesmo sabendo que nem sempre esse procedimento anestésico é o preferido dos pacientes, pelo desconforto que provocam. Como para eliminar ou controlar a periodontite são necessárias, por vezes, várias sessões de instrumentação subgengival em diferentes regiões da cavidade bucal, implicando, como já mencionado anteriormente, em aumento da quantidade de procedimentos anestésicos, tornou-se necessário desenvolver procedimentos que, além de reduzir o medo e ansiedade sentidos pelo paciente frente a presença física de agulhas e seringas, fossem de mais rápida ação, indolores e de simples aplicação para proporcionar, ao paciente, maior conforto e permitir, ao profissional, maior facilidade no tratamento. (PERRY; GANSKY; LOOMER, 2005).

Recentemente, o uso de adesivos impregnados com lidocaína encontrou aplicabilidade no tratamento da dor neuropática (DEVERS; GALER, 2000) e para o controle da dor durante procedimentos não-cirúrgicos para o tratamento da doença periodontal (PERRY; GANSKY; LOOMER, 2005). Em sua forma de base (livre), a lidocaína em conjunto com a prilocaína torna-se uma mistura eutética (mistura de substâncias em forma de pó que, ao serem misturadas, ficam em equilíbrio resultando em um líquido) incorporada em um gel termosensível, que têm sido usada para realização de anestesia não-invasiva, principalmente para as técnicas não-cirúrgicas de controle da doença periodontal (MEECHAN;

THOMASON, 1999; DONALDSON et al., 2003; MAGNUSSON et al., 2003; van STEENBERGHE et al., 2004b).

Portanto, as tecnologias de liberação modificada de fármacos, como por exemplo, a aplicação tópica de gel termosensível dentro das bolsas periodontais, oferecem numerosas vantagens, quando comparadas às formas farmacêuticas convencionais (anestesia injetável), tem permitido obter uma maior eficiência, a redução da toxicidade e o aumento da adesão e conveniência do paciente (KUMAR, 2000; AULTON, 2005).

Atualmente, observam-se no mercado, formas farmacêuticas que apresentam as características descritas acima como, por exemplo, os cremes e géis a base de lidocaína e prilocaína. Dentre os mais estudados podemos citar o EMLA[®] (AstraZeneca do Brasil Ltda) e o Oraqix[®] (DENTSPLY International Inc.). Dos vários sistemas de liberação de fármacos, o de liberação percutânea tem sido amplamente utilizado como um sistema avançado apresentando algumas vantagens no controle e manutenção de vários princípios ativos de ação local. Em suas aplicações percutâneas ou ainda para o uso em odontologia, os anestésicos locais devem permanecer na superfície da pele ou da mucosa bucal em sua forma não-ionizada, além de estar em sua forma lipofílica, para que haja um maior período de substantividade, para que ocorra penetração no estrato córneo e conseqüente dessensibilização da área desejada (SHIN; CHO; YANG, 2004).

Segundo Malamed (2005) o creme EMLA[®] - "*Eutetic Mixture of Local Anesthetics*" – composto de lidocaína 2,5% e prilocaína 2,5%, é uma emulsão na qual a fase oleosa é uma mistura eutética de lidocaína e prilocaína numa proporção de 1:1 por peso. Foi criado como anestésico tópico para ser capaz de fornecer anestesia superficial da pele intacta (os outros anestésicos tópicos não

produzem ação clínica sobre a pele íntegra, apenas sobre a pele que sofreu abrasão), e, como tal, é utilizado principalmente antes de procedimentos dolorosos, tais como punção venosa e outras inserções de agulhas.

Como o EMLA[®] é eficaz na penetração da pele intacta, sua capacidade de produzir anestesia tópica na cavidade bucal parece óbvia, tendo em vista a mucosa apresentar uma permeabilidade maior que a epiderme, devido a menor queratinização de suas camadas mais externas. Embora o rótulo da embalagem (EMLA, 2004) indique seu uso antes de anestesia infiltrativa, não existe nenhuma observação que possa ser usado em cavidade bucal, mesmo para esses fins. Porém, vários estudos clínicos foram publicados demonstrando resultados satisfatórios (DONALDSON; MEECHAN, 1995; VICKERS et al., 1997; MCMILLAN; WALSHAW; MEECHAN, 2000; MUNSHI; HEGDE; LATHA, 2001).

O Oraqix[®], segundo o fabricante e relatos de artigos científicos (FRISKOPP; NILSSON; ISACSSON, 2001; JEFFCOAT et al., 2001; DONALDSON et al., 2003) é definido como uma substância farmacêutica que contém 25 mg/g de lidocaína e 25 mg/g de prilocaína, bem como, ácido clorídrico (adjuvante farmacotécnico ao ajuste do pH), água destilada e um agente termosensível que faz com que a mistura se transforme do estado líquido, em temperatura ambiente, para um estado de gelificação, na temperatura da cavidade bucal. Essa propriedade permite as substâncias ativas permanecerem em posição por um tempo suficiente para que se dê uma ação efetiva, proporcionando uma anestesia adequada na região de eleição. Apesar de conter os mesmos fármacos do EMLA[®], esse gel foi desenvolvido especialmente para ser utilizado em cavidade bucal, principalmente em procedimentos para o controle não-cirúrgico da doença periodontal, onde é implantado dentro do sulco gengival e bolsa periodontal.

As formas farmacêuticas descritas acima como agentes termosensíveis, são conhecidas como poloxamers, que são blocos de copolímeros sintéticos formados por cadeias de oxietileno hidrofílico e cadeias de oxipropileno hidrofóbico (Figura 3).

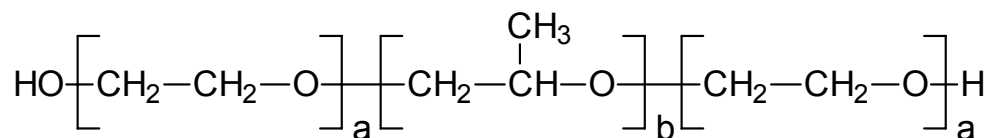


Figura 3. Estrutura química do poloxamer

As letras a e b representam cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas respectivamente. As matérias primas usadas no delineamento da forma farmacêutica do Oraqix[®] - Lutrol F 68[®] e Lutrol F 127[®] - possuem cadeias poliméricas de longa extensão, sendo (a = 80) e (b = 27) para o primeiro e (a = 101) e (b = 56) para o segundo (DENTSPLY, 2005).

De acordo com o fabricante, o Oraqix[®] é considerado como uma microemulsão. Segundo Scherlund et al. (2000), as microemulsões são sistemas bem conhecidos por sua excelente estabilidade em longo prazo e por seu facilitado método de preparo. Elas são definidas como sistemas contendo água, óleo e anfifílicos (molécula que tem ao mesmo tempo um caráter hidrofílico e hidrofóbico, constituindo uma única solução líquida opticamente isotrópica e termodinamicamente estável).

Além da estabilidade física e da facilidade em sua preparação, principalmente em relação aos tratamentos não-cirúrgicos das doenças periodontais, as grandes vantagens de uma forma farmacêutica em microemulsão, de acordo com Scherlund et al. (2000), são: uma alta taxa de liberação das substâncias ativas da

fórmula, devido ao menor tamanho das partículas quando comparadas com as emulsões, como é o caso do EMLA[®].

2.1 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO FARMACOTÉCNICA (DELINEAMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS)

O amplo conhecimento das propriedades físico-químicas dos fármacos, dos adjuvantes farmacotécnicos, e dos processos envolvidos na fabricação de fórmulas magistrais é imperativo para o desenvolvimento de medicamentos que cumpram com os requisitos básicos de eficiência terapêutica e de segurança. Antes do desenvolvimento de uma forma farmacêutica em posologia adequada, é de essencial importância que ela seja caracterizada química e fisicamente. Os estudos de pré-formulação proporcionam o tipo de informação necessária para se delinear a forma farmacêutica mais indicada. Essas informações subsidiam a combinação dos fármacos com os ingredientes farmacotécnicos, assegurando qualidade ao medicamento, dentro da posologia terapêutica (AULTON, 2005).

Segundo Aulton (2005), no âmbito das ciências farmacêuticas, o termo “estudos de pré-formulação” vem sendo substituído por “delineamento de formas farmacêuticas”. Este último termo é utilizado para abranger os vários tópicos da área, que estão associados às diferentes etapas as quais um fármaco é submetido até chegar ao seu desenvolvimento final, ou seja, as etapas que sucedem a descoberta ou síntese do fármaco, o seu isolamento, a purificação, os testes dos efeitos farmacológicos e de problemas toxicológicos. Colocado de modo mais simples, delinear formas farmacêuticas significa transformar um fármaco em um

medicamento. Em relação a esse aspecto, há três tópicos principais a serem considerados:

1. As propriedades físico-químicas do próprio fármaco;
2. Suas características biofarmacêuticas, tais como o motivo pelo qual a via de administração afeta a velocidade e a extensão da absorção de um fármaco no organismo;
3. As características terapêuticas da patologia a ser tratada, que definem o tipo de forma farmacêutica mais adequada, as possíveis vias de administração e a frequência de dosagem do fármaco em pauta.

Os testes de pré-formulação consistem nos passos a serem considerados antes do início da formulação propriamente dita. A pré-formulação envolve uma completa compreensão dos aspectos físico-químicos das moléculas do fármaco e dos adjuvantes e da sua interação na forma farmacêutica (AULTON, 2005).

Guedes (1987) relata que todo o produto pronto deve ter sua monografia analítica contendo as especificações e métodos analíticos, os mais precisos possíveis, além de dados de como: nome e número, testes de pré-formulação recomendados, quantidade e reagentes para cada teste, equipamento necessário, descrição técnica a ser empregada, equações para cálculo e resultados.

É muito útil, por duas razões principais, a toxicológica e a terapêutica, poder prever por qual caminho determinados materiais penetram na pele. A quantidade de determinada substância que é capaz de penetrar na pele e a sua distribuição, relacionada com a concentração da droga, são importantes fatores para a avaliação do risco e no desenvolvimento das formulações para medicamentos de aplicação tópica e transdérmica (HOWES et al., 1996).

Embora a pele tenha sido dividida histologicamente em epiderme, derme e hipoderme, coletivamente ela pode ser considerada como uma só barreira. A passagem através deste conjunto pode ocorrer por meio de: penetração transcelular, penetração intercelular e penetração via anexos (folículos pilosos, glândulas sebáceas, sudoríparas e aparatos pilo - sebáceos) (SHAEFER; REDELMEIER, 1996). Na superfície da pele, a formulação entra em contato com os restos celulares, microrganismos, lipídios e outros materiais, que não afetam a permeação (BRESOLIN et al., 2003).

Segundo Howes et al. (1996), as propriedades da pele como atuação de barreira ou de proteção residem em sua camada mais externa, o estrato córneo (EC), o qual tem aproximadamente 15 μm em um tecido normal. Na pele, o EC atua como dupla barreira, tanto externamente, para limitar a evaporação (perda) de água do corpo, quanto internamente, para permitir a absorção percutânea de agentes externos. Além disso, o EC retém água de maneira eficiente e desse modo mantém a lisura e flexibilidade da superfície da pele.

Da mesma maneira, o epitélio da mucosa bucal também é composto de camadas. Porém, diferentemente da pele, a mucosa bucal pode ter algumas variações em relação à presença e quantidade de queratina, característica principal do EC, em suas camadas mais superficiais, pois pode apresentar-se ortoqueratinizada (totalmente queratinizada) ou paraqueratinizada (quando a queratinização não é completa) ou mesmo não-queratinizada (situação na qual todas as células presentes ainda tem núcleos em seu interior). Segundo Katchburian e Arana (1999), no epitélio não-queratinizado, que compreende as mucosas de revestimento (assoalho bucal, palato mole, mucosa alveolar, mucosa jugal e ventre de língua), não existe a presença dos estratos mais superficiais (granuloso e

córneo). Apesar disso, continuam a apresentar células semelhantes às encontradas nas camadas superficiais da pele, sendo, portanto denominada somente como estrato superficial. Conclusões semelhantes foram relatadas por Florence e Attwood (2004) que afirmam que a mucosa bucal funciona primariamente como uma barreira, pois é pouco permeável. O epitélio de revestimento da mucosa jugal é considerado dos mais espessos da mucosa bucal, pois possui aproximadamente 600 µm de espessura (KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

A absorção percutânea de um composto é fortemente determinada pelas suas propriedades físico-químicas. Embora a formulação tenha um papel importante na determinação do fluxo do composto através da pele, geralmente não influencia a absorção mais que 10 a 20 vezes. Em contraste, o fluxo da absorção, dependendo das várias classes químicas de compostos, pode ser 10^7 vezes maior. Em conseqüência, é essencial entender a habilidade de um composto em passar o estrato córneo antes de estudar o quanto uma formulação pode promover ou modificar a penetração do mesmo (SHAEFER; REDELMEIER, 1996).

Segundo Bresolin et al. (2003), para efetuar correta seleção de fármacos é recomendado observar as propriedades físico-químicas que permitem atravessar (via transporte passivo) a barreira da pele em níveis aceitáveis, tais como, baixo peso molecular (máximo 600 Da), estabilidade, adequada solubilidade óleo/água, alto coeficiente de partição, baixo ponto de ebulição, polaridade, não ser ou não estar ionizado, alta potência, meia vida biológica pequena e não ser irritante para a pele.

As drogas contidas em uma formulação com mais de uma fase (aquosa e oleosa) se movem de uma fase líquida para outra, de maneira dependente de sua concentração relativa e de sua afinidade por cada fase. Desse

modo, uma droga se moverá do sangue para os tecidos extracelulares, se houver uma afinidade apropriada entre membrana celular e a fase não-sanguínea. O movimento de moléculas de uma fase para outra é chamado de partição (FLORENCE; ATTWOOD, 2004). A partição pode ser medida por determinação do coeficiente de partilha em sistemas óleo-água, tal como octanol-água ou clorofórmio-água. O coeficiente de partilha é definido como a razão entre o fármaco não ionizado distribuído entre as fases orgânicas e aquosas em equilíbrio (Figura 4). Segundo Fiese e Hagen (2001) o coeficiente de partilha está relacionado à determinação da lipofilia de um fármaco.

A análise dos grupamentos funcionais de um composto, bem como seu coeficiente de partição, podem predizer adequadamente os coeficientes de permeabilidade na absorção percutânea (GUY; POTTS, 1992).

$$P_{o/a} : \left[\frac{C_{\text{óleo}}}{C_{\text{água}}} \right] \times \text{equilíbrio}$$

Figura 4. Fórmula do coeficiente de partilha.

Para algumas séries de compostos, o coeficiente de partilha constitui uma forma expedita de rastreio para a determinação do comportamento in vivo. Para a administração de fármacos, o equilíbrio lipofílico/hidrofílico, constitui um fator determinante para a velocidade e extensão da absorção do fármaco. Embora os resultados do coeficiente de partilha por si só não permitam prever a absorção in vivo, constituem uma forma de caracterização da natureza lipofílica ou hidrofílica do fármaco (FIESE; HAGEN, 2001).

A liberação de um agente terapêutico de uma formulação aplicada na superfície epitelial e seu transporte para a circulação sistêmica, chamada de absorção percutânea, é um processo de várias fases que envolvem: (a) dissolução do fármaco na formulação e sua liberação, (b) partição dentro da camada mais externa da pele (estrato córneo), (c) difusão através do estrato córneo, principalmente via lipídios intracelulares (este passo limita muitos compostos), (d) partição a partir do estrato córneo dentro da epiderme aquosa viável, (e) difusão através da epiderme viável e dentro da derme superior, e (f) difusão dentro da rede de capilares locais e eventualmente o sistema circulatório (HOWES et al., 1996; BRESOLIN et al., 2003).

A absorção percutânea pode ser determinada por intermédio de dois métodos principais: as técnicas in vitro e as técnicas in vivo.

Os estudos em humanos sem dúvida são o “padrão de ouro” para as pesquisas em absorção percutânea. O propósito de qualquer estudo de absorção percutânea em humanos deve ter objetivos claros, como por exemplo, quando há a necessidade de formular uma nova droga farmacêutica (HOWES et al., 1996).

Já é bem estabelecido que a principal barreira da pele é constituída pelo estrato córneo, a qual também serve de reservatório para as substâncias aplicadas topicamente (ROUGIER; LOTTE, 1993; HOWES et al., 1996; BRESOLIN et al., 2003). Portanto pode-se estabelecer uma correlação com a quantidade do fármaco absorvido nessa camada, tanto na pele quanto na mucosa bucal, e a quantidade dessa substância liberada do veículo. O método emergente para este tipo de estudo é chamado de “Tape Stripping”. O “Tape Stripping” da pele é um procedimento científico extremamente eficaz para se avaliar a quantidade máxima

de absorção percutânea que pode se esperar de uma aplicação tópica (SHAEFER; REDELMEIER, 1996).

Nesse procedimento, a penetração do fármaco é estimada por meio da sua quantidade restante, recolhida quando da remoção das fitas adesivas, após um determinado tempo de aplicação da substância. Em outras palavras, dentro de um período de tempo limitado de exposição ao fármaco, a fração da dose que penetra no estrato córneo, tanto da pele quanto da mucosa é a soma do produto obtido quando da remoção das fitas adesivas e que não pôde ser removido por uma simples lavagem mecânica e que, portanto, alcançará a circulação sanguínea e consequentemente será excretada (HOWES et al., 1996).

A utilização desse método parece ser mais acessível para o teste de novas drogas e, portanto pode prever seus efeitos tóxicos e farmacológicos. Também pode evitar algumas dificuldades éticas de experimentos em humanos, particularmente no caso de agentes potencialmente tóxicos até porque, é bem estabelecido em literatura, que esse método não é considerado invasivo (ROUGIER; LOTTE, 1993).

Entre a literatura científica pertinente sobre esse assunto podemos verificar que existem inúmeros trabalhos que relatam o desenvolvimento de medicamentos de liberação tópica e/ou transdérmica e avaliação de fórmulas farmacêuticas para liberação tópica de fármacos em cavidade bucal, como, por exemplo, o trabalho de Shin; Cho e Yang (2004) que desenvolveram um gel anestésico a base de lidocaína em gel de hidrixipropil-metilcelulose e poloxamer 407 para determinar a praticidade da liberação das substâncias frente à incorporação de diferentes promotores de absorção, mostrando a importância desse tipo de veículo para sistemas de liberação controlada de fármacos.

Junginger; Hoogstraate e Verhoef (1999) estudaram, in vitro, a liberação de dextranas de diferentes pesos moleculares como um composto modelo para peptídeos e proteínas através da mucosa bucal, bem como, a liberação de fármacos in vivo, em porcos. O objetivo da pesquisa foi investigar as propriedades de permeação da barreira do epitélio bucal, com ou sem a incorporação de promotores de absorção na formulação desenvolvida, e também determinar os caminhos de transporte dos compostos modelo através da mucosa bucal.

Além disso, pesquisas como as de Reddy et al. (2002) e Löffler; Dreher e Maibach (2004) estudaram o aperfeiçoamento dos protocolos para a realização dos trabalhos de absorção percutânea que envolvem o método do “Tape Stripping” observando variáveis como, o sitio anatômico em que será realizada a técnica, a pressão exercida sobre a fita adesiva, bem como a duração dessa pressão, e ainda, a velocidade em que o adesivo é removido, podem influenciar na coleta dos dados, gerando ou não vieses de aferição.

Uma outra maneira para se estabelecer os graus de absorção de um determinado fármaco, como já citado anteriormente, são os estudos in vitro e, dentre eles, tem-se enfatizado o uso do sistema de células de difusão. Esse método determina a quantidade da substância ativa testada que ultrapassa as camadas superficiais da pele e, conseqüentemente, é incorporada à circulação sanguínea (OECD, 2004).

Apesar dos estudos de difusão de células serem utilizados de diferentes maneiras, existem realmente apenas dois tipos básicos: as células de uma câmara e as de duas câmaras. A primeira é composta por uma câmara situada abaixo da porção da pele em estudo, existindo contudo, uma comunicação entre a camada superficial desta e o meio ambiente. A segunda possui duas câmaras de

volumes iguais que são separadas pela pele (BRONAUGH, 1996). Cada método tem sua indicação dentro dos estudos de absorção percutânea.

A exposição da pele às substâncias que irão permeá-la, geralmente, ocorre sob condições bastante diferentes daquelas criadas quando se opta pelo uso do sistema de duas câmaras, pois, de maneira clínica, na maioria das vezes, não se oclui a substância de aplicação. Por isso mesmo, o ideal é se optar pelo uso do sistema de uma câmara que, certamente reproduz, mais fielmente as condições encontradas no tratamento dos pacientes (BRONAUGH, 1996).

A câmara, situada abaixo da pele, serve como um compartimento para o fluido receptor que está continuamente em agitação magnética. Este irá receber as substâncias ativas permeadas através da pele para, posteriormente, ser coletado e analisado em relação à quantidade total dos fármacos absorvidos. As células de difusão devem garantir um bom vedamento ao redor da pele e permitir uma fácil coleta do fluido receptor. Devem ser feitas de um material inerte, como, por exemplo, vidro, para minimizar as interações com as substâncias testadas (BRONAUGH, 1996).

Juhlin; Hagglund e Evers (1989) avaliaram a absorção da lidocaína e prilocaína após a aplicação do EMLA[®] sobre a pele humana normal (Grupo controle, n=30) e pele doente (Grupo teste – pacientes com psoríase, dermatite atópica e com dermatite de contato, n=12) por um período de 1 a 2 horas, com ajuda de bandagem oclusiva. O método utilizado para a análise da absorção das drogas empregou coleta sanguínea dos voluntários, em diferentes tempos, para posterior análise em fragmentografia. A absorção da pele doente foi mais rápida quando comparada com a pele normal, com concentrações plasmáticas maiores e uma maior e mais rápida ação anestésica.

Com o mesmo objetivo dos autores supracitados, Friskopp e Huledal (2001) e Herdevall et al. (2003) utilizaram, para a análise da absorção em plasma sanguíneo, as técnicas de cromatografia de gradiente líquido e espectroscopia de massa em conjunto com ionização eletrostática e monitoração de íons selecionados. Em ambas as pesquisas os resultados demonstraram uma boa margem de segurança no que diz respeito às concentrações tóxicas de lidocaína e prilocaína para o sistema nervoso central, não demonstrando efeitos colaterais importantes.

2.2 ESTUDOS EM ANIMAIS

Ainda, em fases de desenvolvimento de formulações farmacêuticas, é importante que se realizem testes para avaliar a resposta inflamatória causada em tecido conjuntivo e epitelial, frente a exposição, prolongada ou não, desses produtos em sua superfície. Algumas técnicas podem ser usadas para analisar esse parâmetro. Dentre elas, a de análise da permeabilidade vascular, que avalia a resposta inflamatória de fase aguda, e a análise histológica do tecido subcutâneo de ratos, após a implantação de tubos de polietileno têm sido utilizadas mais comumente (CANOVA et al., 2002; BRUNINI, 2003; NAGEM-FILHO et al., 2003; RIBEIRO, SANCHES e OKAMOTO, 2003; GEHLEN et al., 2004; VALERA et al., 2004; SILVA, ALMEIDA e SOUSA, 2004; COSTA, HEBLING e SOUZA, 2005; SOUSA, BRAMANTE e TAGA, 2005).

2.2.1 Análise da Permeabilidade Vascular

Desde 1943, com os primeiros estudos de Rawson citado por Gehlen et al. (2004), o Azul de Evans tem sido utilizado para análise da permeabilidade vascular. Porém, o método mais usado atualmente, para a utilização desse corante foi o descrito por Ukada et al. (1970), que tem sido empregado para quantificar o potencial irritante de inúmeras substâncias aplicadas em tecido subcutâneo. Esse método analisa de maneira físico – química o exsudato plasmático produzido depois de um aumento da permeabilidade vascular devido a presença de alguma solução irritante, sendo este procedimento utilizado em diversas pesquisas com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória inicial das mais diversas substâncias (CANOVA et al., 2002; BRUNINI, 2003; NAGEM-FILHO et al., 2003; GEHLEN et al., 2004; VALERA et al., 2004; SILVA, ALMEIDA e SOUSA, 2004; SOUSA, BRAMANTE e TAGA, 2005)..

Este corante apresenta algumas características como inocuidade, alta solubilidade em água e afinidade pela albumina. O Azul de Evans, quando inoculado via endovenosa, combina-se com a albumina de maneira reversível (GEHLEN et al., 2004).

A inflamação de fase aguda provoca alterações no fluxo sanguíneo, no calibre dos vasos e na permeabilidade vascular. O exsudato produzido quando existe alteração da permeabilidade vascular contém mais proteínas plasmáticas do que em situação normal (GUYTON, 1976).

O Azul de Evans se combina com a base de nitrogênio da albumina plasmática formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial, conseqüentemente, ao se promover uma injúria em qualquer

tecido vivo haverá a formação de uma reação inflamatória, com aumento do exsudato plasmático para o tecido lesado, naturalmente com extravasamento de albumina e, portanto, com aumento ou elevação das concentrações de Azul de Evans nesse tecido (SOUSA; BRAMANTE e TAGA, 2005).

Segundo Sousa; Bramante e Taga (2005) a utilização da injeção de Azul de Evans para a análise da resposta inflamatória de fase aguda de agentes irritantes é uma maneira simples e direta para avaliar materiais de uso odontológico, pois segundo Canova et al. (2002) a presença deste corante nos locais de agressão permite estimar a intensidade do processo inflamatório.

2.2.2 Análise histológica

Segundo Costa, Hebling e Souza (2005) e Ribeiro, Sanches e Okamoto (2003), para os testes biológicos em que se determina o potencial irritante de soluções, podem ser empregados os tubos de polietileno, sendo estes preenchidos com a substância de teste e implantados no tecido subcutâneo de ratos.

Os tubos de polietileno foram empregados por Torneck, em 1966, para avaliar a resposta tecidual frente à luz dos tubos, simulando a condição clínica de deficiência de obturação de condutos radiculares, sendo possível, portanto, verificar a existência alternadamente de formação de uma ponte fibrosa e de crescimento infiltrativo.

Os efeitos de soluções anestésicas nos tecidos foram relatadas por Carvalho et al. (1976) que verificaram a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos frente a implantação de tubos de polietileno contendo cones de papel

absorvente embebidos em diferentes soluções anestésicas, encontradas para a venda na época do estudo. A intensidade da reação inflamatória, segundo os autores, variou conforme o tipo de solução anestésica utilizada, sendo menos irritantes aquelas formuladas sem vasoconstritores. Os anestésicos a base de lidocaína foram os que apresentaram menor intensidade da reação inflamatória do tecido subcutâneo de ratos enquanto o produto a base de prilocaína e felipressina, foi um agente irritante aos tecidos.

A pesquisa de Ribeiro, Sanches e Okamoto (2003) teve como objetivo comparar as reações teciduais causadas pela implantação de diferentes substâncias no tecido subcutâneo de ratos. Para tanto foram utilizados 40 animais divididos em cinco grupos. Foram avaliadas as seguintes substâncias: lidocaína a 2% sem vasoconstritor, bupivacaína a 0,5% com 1:200.000 de adrenalina, solução de articaína a 4% e mepivacaína a 2%, ambas com adrenalina 1:100.000 e como grupo controle foi utilizada solução salina a 0,9%. Cones de papel absorvente foram embebidos com as soluções teste e controle e posteriormente implantados dentro de tubos de polietileno no tecido subcutâneo de ratos, após receberem anestesia geral. Os períodos de avaliação foram realizados em 1, 2, 5 e 10 dias. Os resultados obtidos mostraram diferenças na irritabilidade dos tecidos produzida pelos anestésicos locais. Os resultados também mostraram que não existe correlação entre a concentração da droga e a intensidade da reação produzida. As soluções que promoveram menor processo inflamatório foram a mepivacaína e a articaína quando comparadas com a bupivacaína e, de todas, a lidocaína produziu a reação inflamatória menos extensa.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivos:

1. Promover a manipulação, controle das propriedades físico-químicas e absorção percutânea de um gel magistral à base de lidocaína (25 mg/g) e prilocaína (25 mg/g) – Gel Teste.
2. Analisar a biocompatibilidade por meio da resposta inflamatória utilizando a análise da permeabilidade vascular e histológica de diferentes agentes anestésicos tópicos: Gel Teste (gel magistral à base de lidocaína - 25 mg/g - e prilocaína - 25 mg/g) e EMLA[®] implantados no tecido subcutâneo de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DAS FORMAS FARMACÊUTICAS

4.1.1 Manipulação das formulações anestésicas tópicas termosensíveis

4.1.1.1 Manipulação do excipiente (Gel Poloxamer) para o Gel Teste

Essa fase da pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEPG, utilizando técnicas de desinfecção e anti-sepsia preconizadas à manipulação farmacêutica por Pelczar (1996) e Brasil (2000).

Inicialmente, realizou-se a manipulação do gel a base dos polímeros em bloco do oxietileno e oxipropileno, Lutrol[®] F 68¹ (Poloxamer 188) e Lutrol[®] 127^{**} (Poloxamer 407), com base na formulação indicada abaixo (Tabela 1) e de acordo com a técnica preconizada pela literatura (FERREIRA, 2002).

Tabela 1 – Formulação do gel base de Poloxamer 407 e 188.

Substância	Quantidade
Poloxamer 407	15,5 g
Poloxamer 188	5,5 g
Sorbato de potássio	0,2 g
Água destilada previamente gelada q.s.p.	100,0 mL
Total	100 g

¹ BASF[®], São Bernardo do Campo, São Paulo.

^{**} BASF[®], Guarulhos, São Paulo.

A água destilada foi previamente resfriada. Em seguida, mediu-se 100 mL em uma proveta. Verteu-se para um béquer de 250 mL e marcou-se, externamente, o nível de 100 mL. Após, verteu-se novamente a água gelada para a proveta, deixando no béquer aproximadamente 30 mL.

Pesaram-se com exatidão os pós, transferindo-os para o béquer (Prancha 1 – A) completando-se com a água gelada da proveta até a marca de 100 mL (Prancha 1 – B). Homogeneizou-se com o bastão de vidro até que todas as partículas do polímero estivessem em contato com a água (Prancha 1 – C). Cobriu-se com filme de PVC e levou-se a refrigeração até a dissolução total dos polímeros (Prancha 1 – D).

4.1.1.2 Manipulação do Gel Teste

Em seguida, procedeu-se a manipulação do gel a base de lidocaína livre (base)² e prilocaína livre (base)*, de acordo com a tabela descrita abaixo (Tabela 2) contendo o mesmo gel base descrito anteriormente, como excipiente, de agora em diante, designado como Gel Poloxamer. Da mesma maneira, utilizamos a técnica preconizada pela literatura (FERREIRA, 2002).

Tabela 2. Formulação do gel a base de lidocaína e prilocaína não-ionizadas.

Substância	Quantidade
Lidocaína base	2,5 g
Prilocaína base	2,5 g
Ácido clorídrico	q.s. (pH = 7,8)
Gel base de Poloxamer 407 e 188	100,0 g
Total	100 g

² Nortec Química, Rio de Janeiro, Brasil.

* Nortec Química, Rio de Janeiro, Brasil.

O Gel Poloxamer foi retirado da geladeira no momento da manipulação. Em um gral, com o auxílio do pistilo, foram triturados os sólidos, lidocaína e prilocaína ambos em sua forma de base (livres), observando-se a formação de uma mistura eutética. Sobre o gral, em balança digital calibrada, pesou-se o Gel Poloxamer até que se obtivesse o peso desejado, no caso, um total de 100g. A formulação foi transferida para um béquer e levada para geladeira. Mediu-se o pH, colocando-se, gota a gota, q.s. do ácido clorídrico. O pH final da formulação foi de 7,8. Finda a preparação, acondicionou-se a forma farmacêutica em frasco de vidro hermeticamente tampado sendo conservado sob refrigeração.

4.1.2 Controle de qualidade das formas farmacêuticas

Após a etapa de manipulação, procedeu-se o controle de qualidade das formulações manipuladas para a pesquisa (Gel Poloxamer e Gel Teste), baseando-se em aspectos físico-químicos e microbiológicos.

4.1.2.1. Determinação dos valores de pH

Os valores do pH foram obtidos em triplicata com um potenciômetro digital³ previamente calibrado, conforme descrito nos métodos gerais da Farmacopéia Brasileira 4ª edição (COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

³ DMPH-2 (Digimed, Brasil).

4.1.2.2. Determinação da densidade relativa

A determinação da densidade relativa foi realizada utilizando-se o método do picnômetro, segundo à Farmacopéia Brasileira 4^a edição (COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Para tanto, foi utilizado um picnômetro com capacidade total de 25 mL e água destilada como líquido de referência. Os valores foram obtidos em triplicata.

4.1.2.3 Determinação da consistência das formulações

A consistência das formulações foi avaliada por meio do escoamento entre duas placas de vidro, baseando-se no método descrito por Panzeri *et al.* (1979), frente à aplicação de uma massa aferida de 1 g, por 5 minutos, sob pressão e peso constantes. Após esse tempo, realizou-se a mensuração do diâmetro do halo com régua graduada em centímetros, resultante da aplicação da força durante o tempo indicado anteriormente, e realizado sob diferentes temperaturas, sendo elas 22° (temperatura ambiente), 30°, 37° e 40° Celsius. As placas de vidro tinham uma massa média de 761,54 g e mediam 20 cm². A temperatura de ensaio foi estabilizada em placa de aquecimento e controlada por intermédio de termômetro de mercúrio para que permanecesse constante durante o período de observação, para cada substância testada. Os valores foram obtidos em triplicata.

4.1.2.4 Estudo microbiológico

O estudo microbiológico foi desenvolvido utilizando o kit Newplus I⁴, comumente empregado para o controle microbiológico de medicamentos e cosméticos.

Utilizou-se 1,00 g do Gel Teste e do Gel Poloxamer, que foram transferidos com o auxílio de espátula plástica estéril para o caldo Letheen, que contém lecitina e polissorbato 80 na composição, para inativar o sistema conservante. Em seguida, com pipeta esterilizada, aspirou-se 1 mL da solução e colocou-se nos meios agar Letheen (meio altamente nutritivo, contendo agentes neutralizantes da atividade bactericida de compostos quaternários de amônio), agar Mac Conkey (agar seletivo e diferencial, que inibe o crescimento de bactérias Gram positivas, possibilitando assim, um melhor desenvolvimento das bactérias Gram negativas, especialmente as enterobactérias) e agar Sabouraud dextrose (meio utilizado para o isolamento de fungos, sejam eles leveduriformes ou não).

A avaliação do crescimento bacteriano foi feita após 12 h de incubação na temperatura de $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. A verificação do crescimento fúngico foi realizado após 1 semana, em temperatura ambiente. O Gel Poloxamer também foi avaliado, nas mesmas condições descritas anteriormente.

⁴ Newprov[®], Pinhais, Brasil.

4.1.3 Determinação do coeficiente de partilha

Essa fase da pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cosmetologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEPG, utilizando técnicas de desinfecção e anti-sepsia preconizadas à manipulação farmacêutica por Pelczar (1996) e Brasil (2000).

Inicialmente, foi preparada uma solução de octanol, pré-saturado em água, contendo as substâncias ativas (lidocaína e prilocaína) em concentrações pré-determinadas. Essa solução foi estocada em condições apropriadas para que se assegurasse sua estabilidade química.

O ensaio foi realizado em temperatura ambiente e constante (22° C), mantendo-se, assim, dentro do padrão sugerido na literatura, que não deve ser inferior a 20° C ou superior a 25° C. A solução preparada foi colocada em 10 tubos de ensaio de 10 mL, divididos em dois grupos (n=5) sendo, um para a análise da fase oleosa e outro para a análise da fase aquosa dos fármacos. Os tubos foram agitados manualmente (fazendo-se uma rotação, de 180° e invertendo-o, aproximadamente 100 vezes, durante cinco minutos), de maneira a permitir a incorporação de ar entre as duas fases, ou seja, estabelecendo um equilíbrio entre elas. A separação das duas fases foi realizada por meio de centrifugação a 2500 rpm por 10 min.

Na determinação do coeficiente de partilha é necessário que se estabeleçam as concentrações das substâncias testadas em ambas as fases. Para tanto, foi retirada uma fração de cada uma das fases, dependendo da análise a ser realizada (oleosa ou aquosa), destinada à mensuração das substâncias ativas, por meio de espectrofotometria de luz ultravioleta, num comprimento de onda de 220

nm, para a lidocaína e 240 nm, para a prilocaína, previamente estabelecidos em estudo piloto.

Primeiramente fez-se a coleta da fase aquosa. Para que esse procedimento fosse executado de forma a garantir que não houvesse vestígios de octanol na amostra, foi utilizada uma agulha e uma seringa descartáveis, esta preenchida com um pouco de ar. Enquanto a agulha estava sendo introduzida na fase oleosa, o ar contido na seringa foi sendo expelido, de forma a garantir a qualidade (não contaminada) da parcela aspirada. A agulha foi então rapidamente retirada da mistura, de modo a não permitir a adesão de octanol em sua superfície, sendo após, descartada. Já na coleta da fase oleosa, a amostra foi recolhida diretamente do meio oleoso, logo após a centrifugação, dispensando-se os cuidados necessários à fase anterior, uma vez que o produto concentra-se na parte superior do frasco. O material coletado foi separado em recipientes individuais, todos adequadamente marcados e separados, para posterior análise.

Usualmente, os valores obtidos após a determinação da absorbância por espectrofotometria de luz ultravioleta são descritos na forma de um logaritmo na base P ($\log P$) e estão situados, geralmente, entre -2 e 4.

4.1.4 Absorção percutânea

Nessa etapa da pesquisa, realizaram-se testes, *in vitro*, sobre pele humana e, *in vivo*, em mucosa bucal, para a determinação da absorção percutânea. Nos testes *in vitro*, a pele utilizada foi obtida por meio de doação, após remoção em cirurgia plástica de abdômen, no Hospital Vicentino, Ponta Grossa, PR. Os testes *in vivo*, foram realizados em voluntários, todos estudantes da UEPG e foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa dessa instituição, sob protocolo nº

2300/05. Realizaram-se os testes de absorção percutânea, in vitro, utilizando o método do “Tape Stripping” de acordo com as normas internacionais do ECVAM - *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (HOWES et al, 1996) e o de absorção percutânea total, utilizando o sistema de células de difusão (Células de Franz), de acordo com a normativa da OECD - *Organisation for Economic Co-Operation and Development* (2004). Para o teste in vivo, o método do “Tape Stripping” foi utilizado em mucosa bucal, utilizando as mesmas normas citadas anteriormente.

Foram avaliados dois grupos de estudo:

1. GRUPO I (Gel Teste): gel manipulado na UEPG a base de lidocaína base (25 mg/g) e prilocaína base (25 mg/g) e excipiente a base de Poloxamer 407 e 188.
2. GRUPO II (EMLA^{®5}): creme dermatológico a base de lidocaína (25 mg/g) e prilocaína (25 mg/g), considerado parâmetro de avaliação, uma vez que é um produto comercial, largamente utilizado em odontologia.

Para tanto, antes dos procedimentos in vitro propriamente ditos, a pele foi tratada de modo a ser removida toda a camada gordurosa presente abaixo da derme e então lavada com solução salina (NaCl) a 0,9% para remoção de impurezas e restos gordurosos.

⁵ AstraZeneca do Brasil Ltda.

4.1.4.1 – Estudos in vitro

4.1.4.1.1 – Método do “Tape Stripping”

A pele obtida foi cortada em 6 pedaços menores (sendo três para cada grupo de estudo), de aproximadamente 3 cm² cada um, e então fixados em uma plataforma, de maneira que ficassem imóveis para a realização da técnica. Importante ser citado que a pele usada para esse tipo de experimento não deve ter sido removida a mais de 2 horas, para que permaneçam intactas suas propriedades fisiológicas normais e de metabolismo.

A região a ser trabalhada foi então demarcada com uma proteção de plástico, medindo 3 cm² de área total, sendo vazada em seu interior uma área de 1 cm², designada como área de trabalho.

Para realização desta etapa da pesquisa foi preciso realizar uma adaptação à técnica original recomendada pela ECVAM (HOWES et al, 1996), pois, naquele procedimento está prescrito um período de observação de 30 minutos, porém, tendo em vista a utilização dos fármacos testados em procedimentos odontológicos necessitarem de um curto tempo de ação, o período de observação foi reduzido à 1 minuto. Outra adaptação diz respeito a quantidade aplicada da forma testada; em experimentos normais essa dose é de 2 mg/cm² ou 50 µl quando se trata de líquidos. Valores que não condizem com o tipo de aplicação utilizado em procedimentos clínicos de periodontia.

Portanto, os seguintes passos fazem parte da técnica:

1. Depois de escolhida e demarcada a região de trabalho, esta foi limpa gentilmente com auxílio de gaze e solução salina (NaCl) a 0,9%.
2. Aplicação da formulação farmacêutica (Grupo I e Grupo II) por um período de 1 minuto topicamente sobre a região, em uma quantidade de 250 mg.
3. Remoção da formulação farmacêutica com auxílio de swab de algodão, que foi guardado para posterior análise da quantidade da substância inicial.
4. Aplicação da fita adesiva⁶ sobre a região demarcada com pressão controlada, utilizando-se para isso um peso cilíndrico de 50g, por um período de 10 segundos.
5. Remoção do adesivo realizada sempre pelo mesmo operador. Este, chamado de 1º descarte, não é considerado para a análise da porcentagem do fármaco absorvida, porém é reservado e medido posteriormente, para obtenção da quantidade total da substância testada.
6. Aplicação por 15 vezes da fita adesiva utilizando-se o mesmo protocolo descrito no passo 4 e remoção de acordo com o passo 5, sendo estas guardadas em frascos separados para posterior análise da quantidade da substância que foi absorvida no estrato córneo. Os procedimentos foram realizados em triplicata.

Essa seqüência está esquematizada em fotos na Prancha 2 – A, B, C e D.

⁶ Scotch® Book Tape 845, 3M

Os frascos contendo as fitas adesivas foram então preenchidos com 5 mL de álcool etílico absoluto (99,9%) para extração do material obtido nos adesivos. Todos os frascos foram agitados em um agitador do tipo vortex durante 5 minutos a fim de remover o adesivo e conseqüentemente as células aderidas sobre a fita.

Para a quantificação da absorção da substância teste dos grupos do estudo utilizou-se um espectrofotômetro de ultravioleta sob um comprimento de onda previamente obtido através de curvas de calibração para lidocaína e prilocaína, de 220 nm e 240 nm, respectivamente.

4.1.4.1.2 - Avaliação da absorção percutânea em células de difusão in vitro

Foi utilizado o aparelho Microetteplus de Células de Difusão – Hanson Research para a realização desse teste, sendo usado nas dependências d'O Boticário, São José dos Pinhais, PR.

Este equipamento é composto de 6 células de difusão vertical com uma câmara. Portanto, três delas foram usadas para a avaliação do Grupo I e outras três para o Grupo II.

A pele foi previamente preparada com o auxílio de um dermatômômetro (aparelho específico para o corte de pele com espessura definida), tendo espessura média de 200 µm, sendo então cortada em 6 pedaços de mesmo tamanho. Estes foram posicionados em cada uma das células, onde o estrato córneo ficou voltado para cima, em contato com o meio ambiente. Todos eles foram avaliados em relação à integridade física das camadas superficiais do epitélio, por meio de inspeção visual. Cada célula foi preenchida, de maneira automatizada, com um fluido receptor

fisiológico⁷, de modo que este permanecesse em contato direto com a pele por todo o tempo de observação do estudo.

A quantidade da fórmula farmacêutica aplicada foi 60 mg. Para isso, foi usado um bastão de vidro que auxiliou a aplicação da droga na superfície da pele.

Durante determinados intervalos de tempo, amostras do fluido receptor foram colhidas para posterior análise das quantidades de produto que conseguiram permear a pele. Neste estudo, o gel sob investigação foi aplicado sobre a superfície da membrana e realizadas coletas, em intervalos regulares, divididos em períodos de 30 minutos, num total de 3 horas. A fórmula permaneceu na superfície da pele durante todo o período de experimentação, até que fosse removida por um procedimento de limpeza, onde foram realizadas três lavagens, com a mesma solução usada no preenchimento das células, em cada uma delas, e por meio de limpeza mecânica, com auxílio de cotonete de algodão.

Durante todo o período de observação, as células de difusão permaneceram com temperatura constante de 32° C, que é considerada como a temperatura normal da superfície da pele (OECD, 2004).

Ao final do estudo, determinou-se a quantidade das substâncias, sendo assim possível uma estimativa da sua total recuperação, consideradas, inclusive, as quantidades residuais existentes em todas as outras superfícies com as quais elas entraram em contato (bastão de vidro, cotonete, a pele propriamente dita, o fluido receptor e de lavagem, e a câmara das células de difusão).

A absorção na pele foi expressa como a porcentagem da quantidade acumulada, por unidade de tempo.

⁷ Solução tampão de fosfato de sódio

4.1.4.2 – Estudos in vivo

Para a realização do experimento foram selecionados 8 estudantes da Universidade Estadual de Ponta Grossa independentemente do curso em que estivessem matriculados, com mais de 18 anos, do sexo masculino e capazes de compreender o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram adotados alguns critérios de exclusão, tais como: os indivíduos não deveriam relatar história de alergia, sensibilidade ou qualquer forma de reação contra os anestésicos à base de amida; não deveriam possuir qualquer doença sistêmica grave, não-controlada como, por exemplo, problemas cardíacos, neurológicos, renais, hepáticos ou sanguíneos; ou que apresentassem lesões ulcerativas na região em que se procederia o estudo. Indivíduos fumantes foram excluídos.

Antes da realização dos procedimentos os pacientes foram informados (verbalmente e por escrito) a respeito aos objetivos desta pesquisa.

A escolha dos pacientes foi realizada a partir de uma amostra aleatória. O desenho experimental foi o modelo boca dividida.

Todos os pacientes foram submetidos ao método “Tape Stripping” para a realização do teste de absorção percutânea, em mucosa, no qual duas formulações farmacêuticas foram utilizadas, sendo designadas como: Grupo 1- Gel anestésico local a base de lidocaína e prilocaína 5% manipulado na UEPG e Grupo 2- Creme anestésico transdérmico - EMLA®. O período de observação foi de 1 minuto.

A região de escolha para a aplicação da substância foi a mucosa jugal. Os indivíduos tiveram os lábios afastados com a ajuda de um afastador labial,

sendo a demarcação da área feita com fita adesiva⁸, com uma região vazada em seu interior medindo 1 cm² e designada como área de trabalho, e em seguida foi realizada a técnica do “Tape Stripping” que segue:

1. Escolheu-se uma área para a atuação da droga;
2. Limpou-se delicadamente a região com gaze embebida em solução de soro fisiológico;
3. Demarcou-se a área com fita adesiva (Micropore – 3M) (Prancha 2 – E).
4. Aplicou-se a formulação por 1 minuto;
5. Removeram-se os excessos com um swab de algodão, sendo este guardado para posterior análise;
6. A secagem da região não foi realizada;
7. Realizou-se uma vez o stripping sendo guardado para posterior análise e designado como 1º descarte.
8. Realizou-se mais 5 vezes o stripping usando a fita adesiva da 3M;
9. Removeu-se o Micropore – 3M sendo guardado para posterior análise;
10. Realizou-se a extração das células do adesivo usando um solvente apropriado;

⁸ Micropore ® - 3M

4.2. AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE

Para se testar os parâmetros de biocompatibilidade realizaram-se, em um primeiro momento, a análise da permeabilidade vascular, que avalia a resposta inflamatória aguda após a implantação das substâncias químicas testadas, em tecido subcutâneo de animais. Em um segundo momento, foram análises histológicas de biópsias provenientes de tubos de polietileno preenchidos com as substâncias testadas, implantados no tecido subcutâneo dos animais, gerando um processo inflamatório de fase crônica ou tardia.

Para a realização deste estudo, foram constituídos oito grupos experimentais, sendo divididos em 4 grupos para a análise de permeabilidade vascular e 4 grupos equivalentes para a análise histológica (Quadro 1).

Quadro 1 – Divisão dos grupos de estudo para os testes de avaliação de biocompatibilidade.

Quadro 1 - Divisão dos grupos de estudo para os testes de avaliação de biocompatibilidade:			
Grupos	Substâncias	(n) Estudo de permeabilidade vascular	(n) Análise histológica
Grupo I	(Gel Teste): gel manipulado na UEPG a base de lidocaína base (25 mg/g) e prilocaína base (25 mg/g) e veículo a base de Poloxamer 407 e 188.	3 horas: 5	2 dias: 5
		6 horas: 5	5 dias: 5
		9 horas: 5	15 dias: 5
		n = 15	n = 15
Grupo II	(EMLA®): creme dermatológico a base de lidocaína (25 mg/g) e prilocaína (25 mg/g)	3 horas: 5	2 dias: 5
		6 horas: 5	5 dias: 5
		9 horas: 5	15 dias: 5
		n = 15	n = 15
Grupo III	(Gel Poloxamer): gel manipulado na UEPG com veículo a base de Poloxamer 407 e 188.	3 horas: 5	2 dias: 5
		6 horas: 5	5 dias: 5
		9 horas: 5	15 dias: 5
		n = 15	n = 15
Grupo IV	(Controle): solução salina (NaCl) a 0,9 %, para o estudo da permeabilidade vascular e para a análise histológica, somente a cirurgia sem implantação dos tubos de polietileno	3 horas: 5	2 dias: 5
		6 horas: 5	5 dias: 5
		9 horas: 5	15 dias: 5
		n = 15	n = 15
Total		60	60

Para o experimento, foram utilizados 120 animais⁹, 15 indivíduos por grupo, compostos por machos e fêmeas, com idade variando de 2 a 3 meses e peso entre 200 e 300 gramas, procedentes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa, e mantidos sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo de claro/escuro de 12h), com acesso à água e ração Nuvilab[®] ^{**}. Por ocasião do delineamento experimental, cada animal foi transferido ao laboratório de experimentação e mantido por pelo menos 1 h para ambientação antes de qualquer procedimento experimental.

4.2.1 Análise da permeabilidade vascular

Os períodos de avaliação foram de 3, 6 e 9 horas.

A pesquisa foi realizada segundo as normas recomendadas pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Após os procedimentos de anestesia, de acordo com protocolo definido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (MEZADRI; TOMÁZ; AMARAL, 2004) sendo 3,75mL de cetamida – 100mg/mL – (cloridrato de Cetamina a 1% - Vetaset[®] ¹⁰), 0,5mL de xylasina – 100mg/mL – (cloridrato de Xilazina a 0,2 % - Virbaxyl[®] ¹¹) e 5,75mL de água destilada para anestesia, em uma quantidade de 0,2mL/100g de peso do animal, foi aplicado na veia lateral da cauda de cada animal uma solução de Azul de Evans^{***} a 2% na proporção de 20mg/Kg (0,1ml /100g de peso) (Prancha 3 – A). Em seguida, foi realizada a tricotomia do

⁹ *Norvergicus albinus wistar*

^{**} Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo – Brasil

¹⁰ Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA

¹¹ Virbac do Brasil, São Paulo, SP

^{***} INLAR Industria Brasileira

dorso do animal e aplicado no tecido subcutâneo 0,1mL das substâncias a serem testadas em duas regiões distintas (dorso superior e inferior) (Prancha 3 – B). Os animais foram sacrificados por sobre dosagem anestésica após 3, 6 e 9 horas da aplicação das substâncias testes e realizou-se a remoção de biópsia da pele de todo o dorso do animal.

A avaliação da permeabilidade vascular foi realizada por meio da medição da área (mm²) do halo azulado (extravasamento do corante), observado no tecido biopsiado (Prancha 3 – C), por meio de fotografias padronizadas com o auxílio de máquina digital* e análise da área mediante a utilização de software** por um único examinador treinado.

Em seguida, o tecido subcutâneo foi recortado margeando-se a área de extravasamento do corante para as duas regiões de implantação das substâncias teste e uma área adicional para se efetuar o controle para cada animal, portanto obtendo-se três amostras, sendo estas então colocadas em frascos individuais, previamente cortadas em pedaços menores, contendo um solvente Formamida PA^{12**} que realizou a extração do corante. As peças permaneceram por 72 horas em contato com a solução solvente em temperatura controlada de 37 ° C, quando foram removidas e a solução remanescente submetida à centrifugação por 10 minutos a 2.500 RPM. Colocou-se 200 µL de cada amostra, em duplicata, em cada orifício da placa de 96 poços e realizou-se aferição espectrofotométrica em leitor de ELISA**** com filtro de 630 nm de comprimento de onda. Para o branco da amostra foram utilizadas as soluções provenientes das amostras de controle retiradas do tecido dorsal dos animais.

* Câmera digital Sony – DSC – F717

** UTHSCSA Image Tool for Windows 3.0

*** Nuclear. Lote04050707

**** BIOTEK 8000^B BIOSYSTEM

As leituras dos valores de absorbância foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante. As concentrações foram obtidas em µg/mL do tecido biopsiado. Da mesma forma, essa determinação foi realizada igualmente para todos os grupos.

4.2.2 Análise histológica

Os períodos de avaliação foram de 2, 5 e 15 dias.

Para tanto, inicialmente os ratos foram pesados e identificados. Posteriormente foram submetidos à anestesia geral a partir da mesma solução utilizada anteriormente. Realizou-se a tricotomia da região dorsal e anti-sepsia com álcool iodado (95% de álcool a 70% em 5% de iodo). A incisão e divulsão foram executadas mediante uma tesoura de ponta romba¹³. A incisão ocorreu na linha sagital mediana no terço médio do dorso, com cerca de 15 mm (prancha 4 – A).

A divulsão ocorreu tanto do lado direito como do esquerdo com aproximadamente 18 mm de extensão e com 15 mm de largura. Após a divulsão foram implantados tubos de polietileno (sonda naso-gástrica¹⁴) de comprimento de 10 mm, com diâmetro externo de 1,5 mm e diâmetro interno de 1,0 mm, preenchidos com as substâncias que foram testadas de forma que não se observaram bolhas em seu interior. A sutura foi realizada com pontos isolados utilizando-se fio agulhado seda 4.0** e porta-agulha (Prancha 4 – B, C e D).

Cada animal recebeu 2 implantes contralaterais contendo a mesma substância de teste.

* Metzenbaum-14 Duflex® (SS White, Brasil)

¹⁴ n°. 4, *Embramed*®

** Shalon®

No pós-operatório, os grupos de animais permaneceram em suas respectivas caixas, mantendo-os desta forma separados de acordo com o tempo de pós-operatório. Os animais receberam alimentação convencional e água “ad libitum”. Não foi dado nenhum medicamento pós-operatório aos animais.

A biópsia ocorreu depois de transcorrido o tempo determinado para cada subgrupo. Anestesiaram-se novamente os animais. Feita a anti-sepsia com álcool iodado (95% de álcool a 70% em 5% de iodo), quando da colocação dos tubos de polietileno, procedeu-se à biópsia da região implantada. Posteriormente, sacrificou-se o animal por meio de sobre dosagem da solução anestésica. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único operador treinado (Estudo piloto).

Obtiveram-se duas amostras em cada animal (uma do lado direito e outra do esquerdo). Fixaram-se as peças com solução de Alfac (álcool 80% - 85ml, formol - 10ml, ácido acético - 5ml) por 12 horas. Mantiveram-se as biópsias acondicionadas em álcool 70% até o momento do processamento histológico. De acordo com as técnicas laboratoriais para execução desse processo, as peças foram desidratadas em álcool e diafanizadas em xilol. Posteriormente, foram incluídas em parafina, de modo a permitir que o tubo de polietileno permanecesse em posição perpendicular ao micrótomo manual¹⁵ para realização dos cortes. Estes foram realizados transversalmente à região implantada, com 5µm de espessura, e semi-seriados com espaçamento de 150µm. O tubo de polietileno implantado foi utilizado como referência para o término dos cortes, descartando-se as amostras que apresentassem qualquer vestígio de fragmentos deste tubo, evitando-se uma aferição de reação inflamatória causada pela presença física do tubo e não pela

¹⁵ Leica Km 2025. Leica Instruments gmbh

injúria causada pela substância testada (Prancha 5 – A, B e C). Esses cortes foram esticados em banho-maria a 45°C e colocados em lâminas de vidro. Foram utilizadas duas lâminas para cada amostra, coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas histológicas confeccionadas foram avaliadas por meio de microscopia de luz.

Realizou-se análise prévia das lâminas, separando-se as uniformemente isotrópicas (apresentando as mesmas características em todas as direções). As lâminas isotrópicas foram aleatoriamente selecionadas e empregadas para realização de análise qualitativa em microscopia de luz óptica, para observação da reação inflamatória causada pelas substâncias empregadas durante a pesquisa.

Nessa etapa, para cada animal, examinaram-se 4 cortes, sendo 2 para cada lâmina.

A resposta tecidual foi analisada em função das alterações inflamatórias (presença de edema, alterações vasculares e infiltrado inflamatório) e dos processos reparatórios (grau de fibrosamento, proliferação angioblástica e fibroblástica) encontrados nos tecidos adjacentes aos tubos de polietileno. Foram atribuídos escores (de 0 a 3), a cada estrutura analisada, sendo que o escore 0 caracterizava ausência de inflamação, o escore 1 inflamação leve, o escore 2 inflamação moderada e o escore 3 inflamação severa (Análise Semi-quantitativa). Todas as análises foram realizadas por um único examinador previamente calibrado e sem o conhecimento a que grupo as lâminas que estavam sendo avaliadas procediam.

4.3 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

4.3.1 Delineamento de fórmulas farmacêuticas

O controle de qualidade das fórmulas farmacêuticas foi descrito segundo análise estatística descritiva.

4.3.2 Absorção percutânea

Os resultados obtidos com os estudos in vitro e in vivo foram submetidos à análise de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Foi realizada uma análise com o teste t não pareado entre o Grupo I “versus” Grupo II e o nível de significância adotado foi de 0,05.

4.3.3 Permeabilidade vascular

A reprodutibilidade dos dados obtidos com as medições da área do halo de extravasamento do corante foi realizada avaliando-se 20 fotos, em dois momentos distintos (24h), em ordem aleatória, por um único examinador. Os dados foram analisados obtendo-se as diferenças entre as medidas em dois momentos, testando-se a reprodutibilidade através do coeficiente de correlação intraclass. Para a comparação entre os grupos, a análise dos dados obtidos, em mm², foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis. Caso houvesse diferenças significativas entre eles, seria realizado o teste de Mann-Whitney para comparações múltiplas.

Os valores obtidos na medição da concentração do corante extravasado pelo método da espectrofotometria foram analisados pela Análise de Variância por 2 critérios (ANOVA – 2 critérios) considerando as variáveis fixas grupo, tempo, sendo analisada a interação grupo e tempo. Para a comparação múltipla entre os grupos, caso houvesse diferenças significativas, seria utilizado o teste Tukey. A correlação entre as variáveis área (mm²) e valores de concentração (µg/mL) foi obtida por meio do coeficiente de correlação de Pearson.

4.3.4 Análise histológica

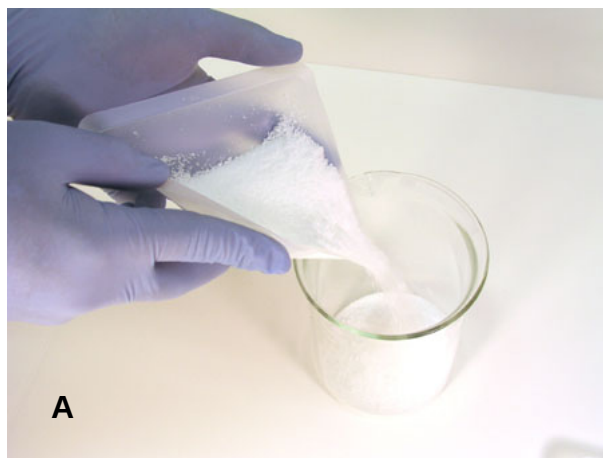
A concordância dos escores de reação inflamatória foi realizada avaliando-se 24 cortes que apresentavam de maneira equivalente todos os escores, em dois momentos distintos (24h), em ordem aleatória, por um único examinador através do teste Kappa ponderado. Para as comparações entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, para cada um dos tempos de observação. Sendo encontradas diferenças estatísticas significativas, seria então usado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação múltiplas entre os tipos de tratamento, para cada tempo.

O nível de significância adotado foi de 0,05. Todos os cálculos foram realizados através do software estatístico SPSS®¹⁶ versão 11.5.1 for Windows**.

¹⁶ *Statistical Package for the Social Science*

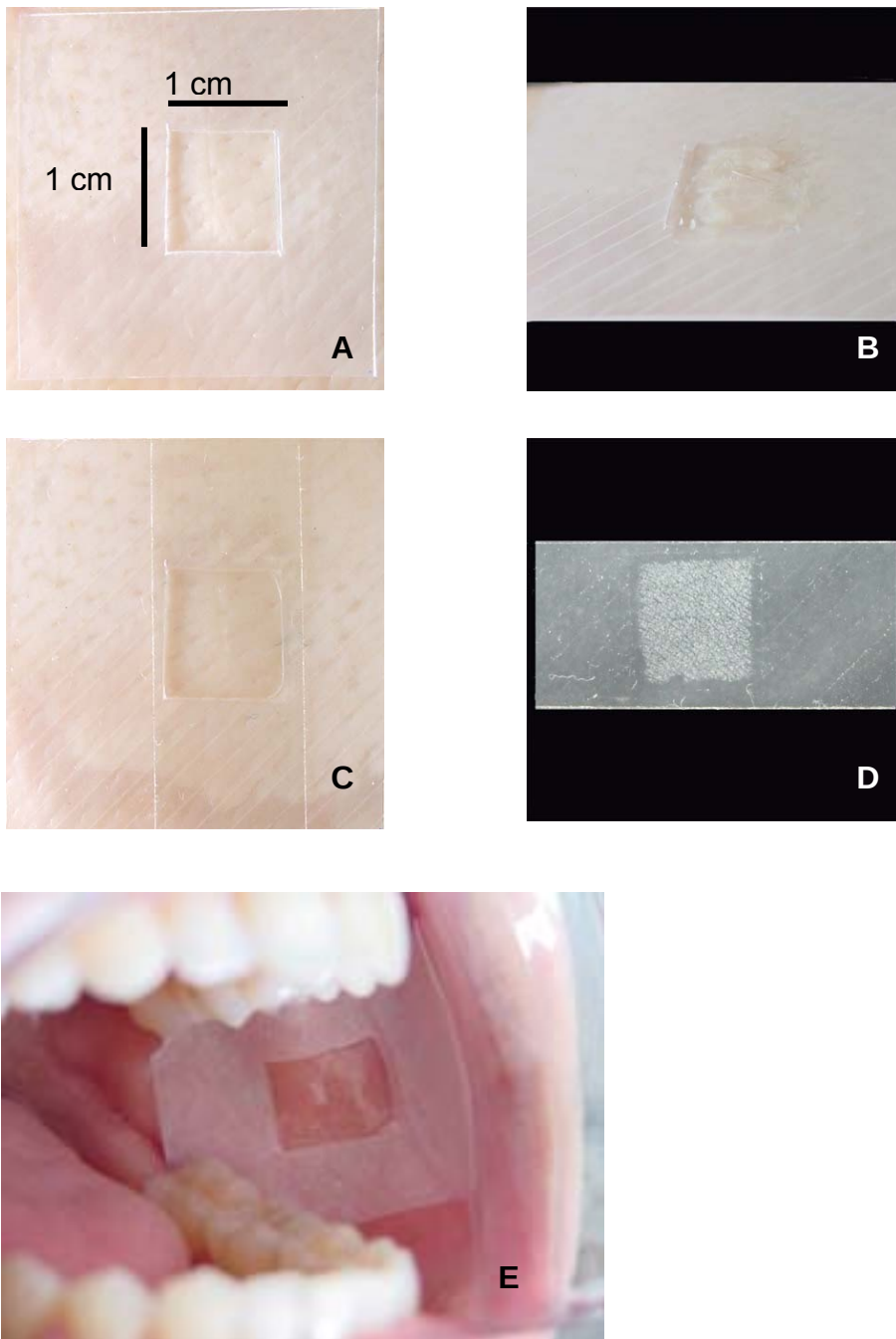
** SPSS Inc. Chicago, Illinois

PRANCHA 1 - Manipulação do veículo para o Gel Teste (Gel Poloxamer)



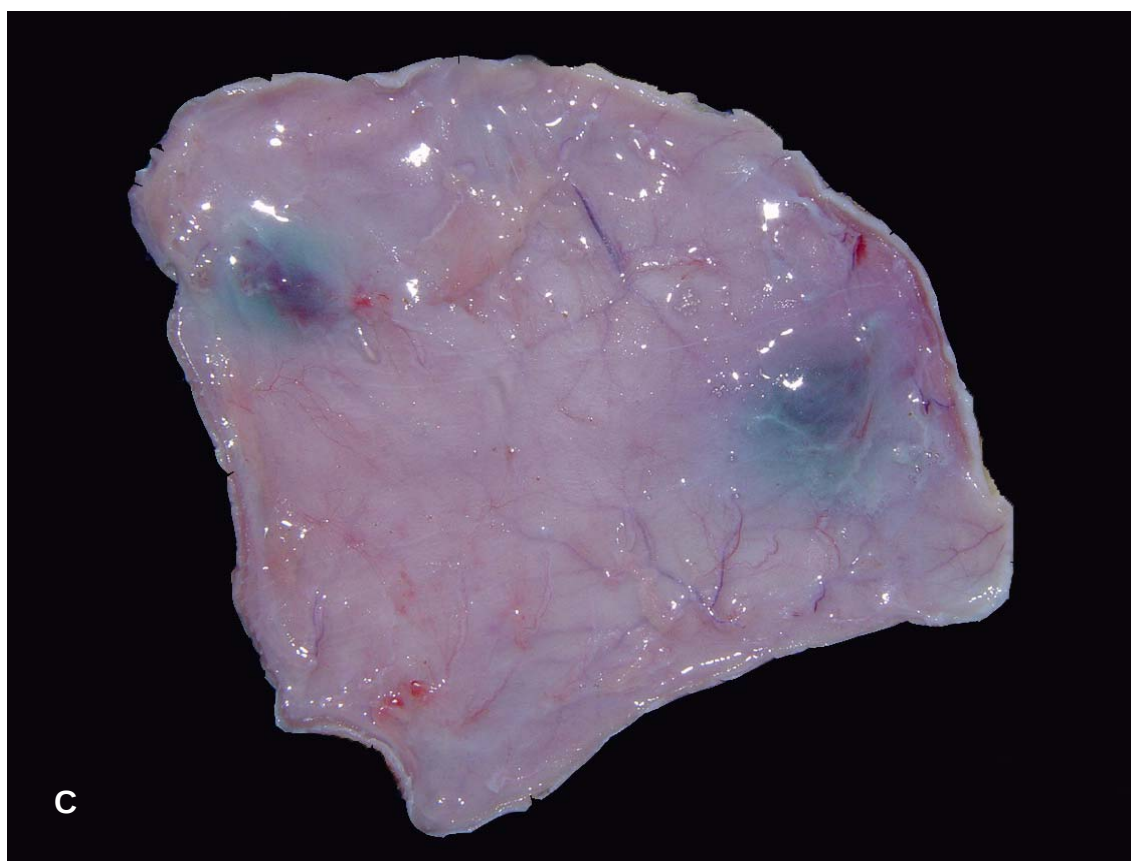
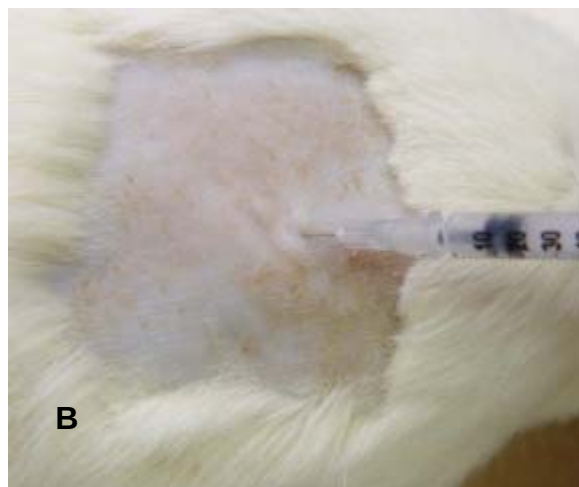
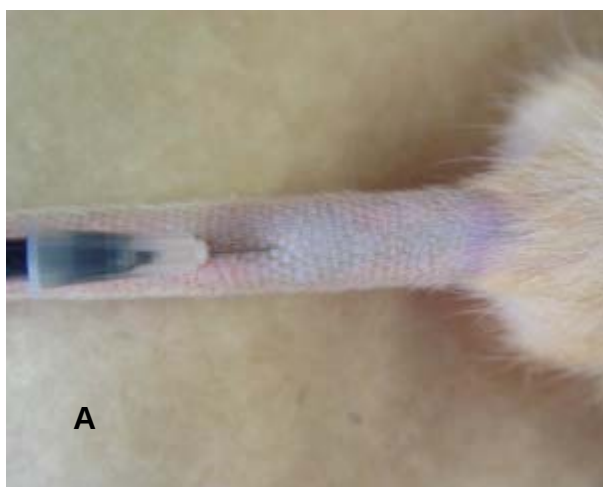
- A. Transferência dos pós para o béquer;
- B. Complementação com água destilada q.s.p.;
- C. Homogeneização da amostra;
- D. Proteção com filme plástico.

Prancha 2 - Esquema dos passos do método do “Tape Stripping”.



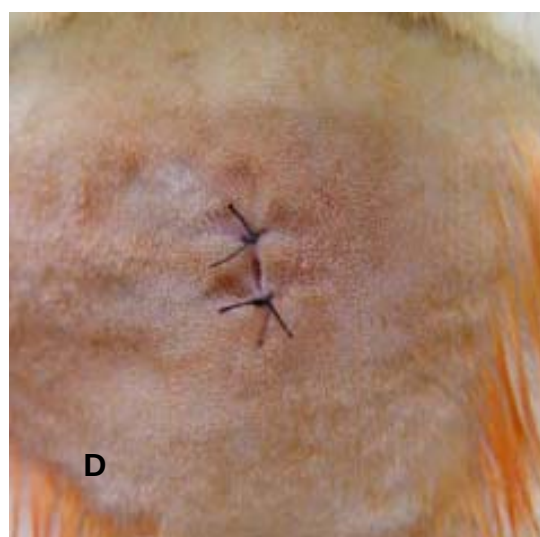
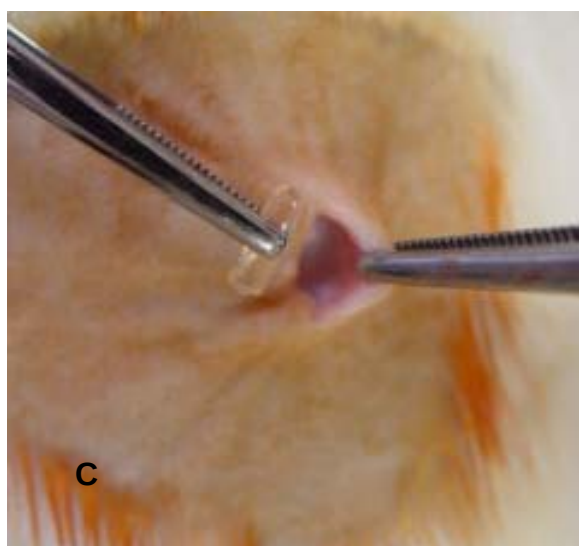
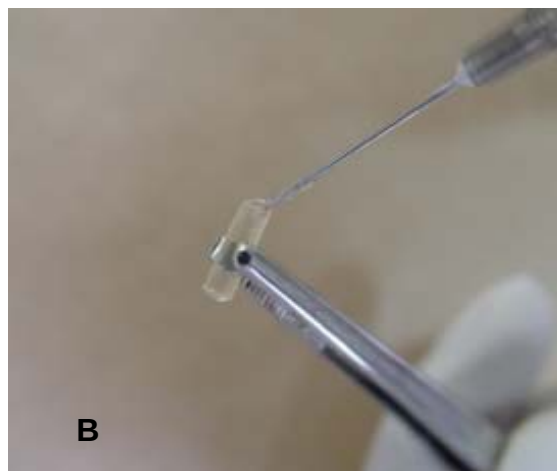
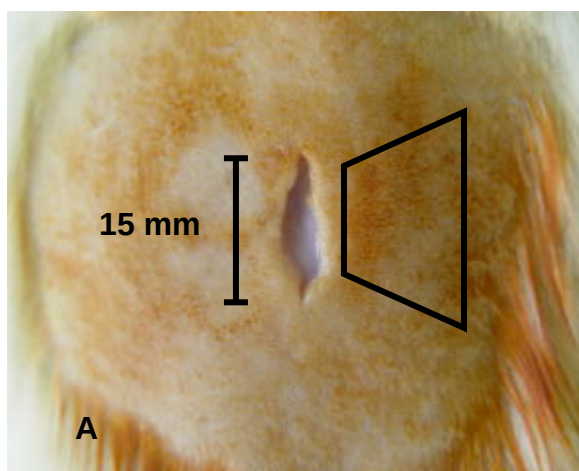
- A** – Demarcação da área de trabalho (1 cm²) em pele humana (Estudo in vitro).
- B** – Aplicação do Gel Teste na área de trabalho em pele humana (Estudo in vitro).
- C** – Aplicação da fita adesiva sobre a área de trabalho em pele humana (Estudo in vitro).
- D** – Visualização das células de estrato córneo aderidas na fita adesiva após a remoção da mesma.
- E** – Visualização da área de trabalho em mucosa bucal (Estudo in vivo).

PRANCHA 3 – Procedimentos para a análise da permeabilidade vascular e remoção do tecido da região dorsal do animal.



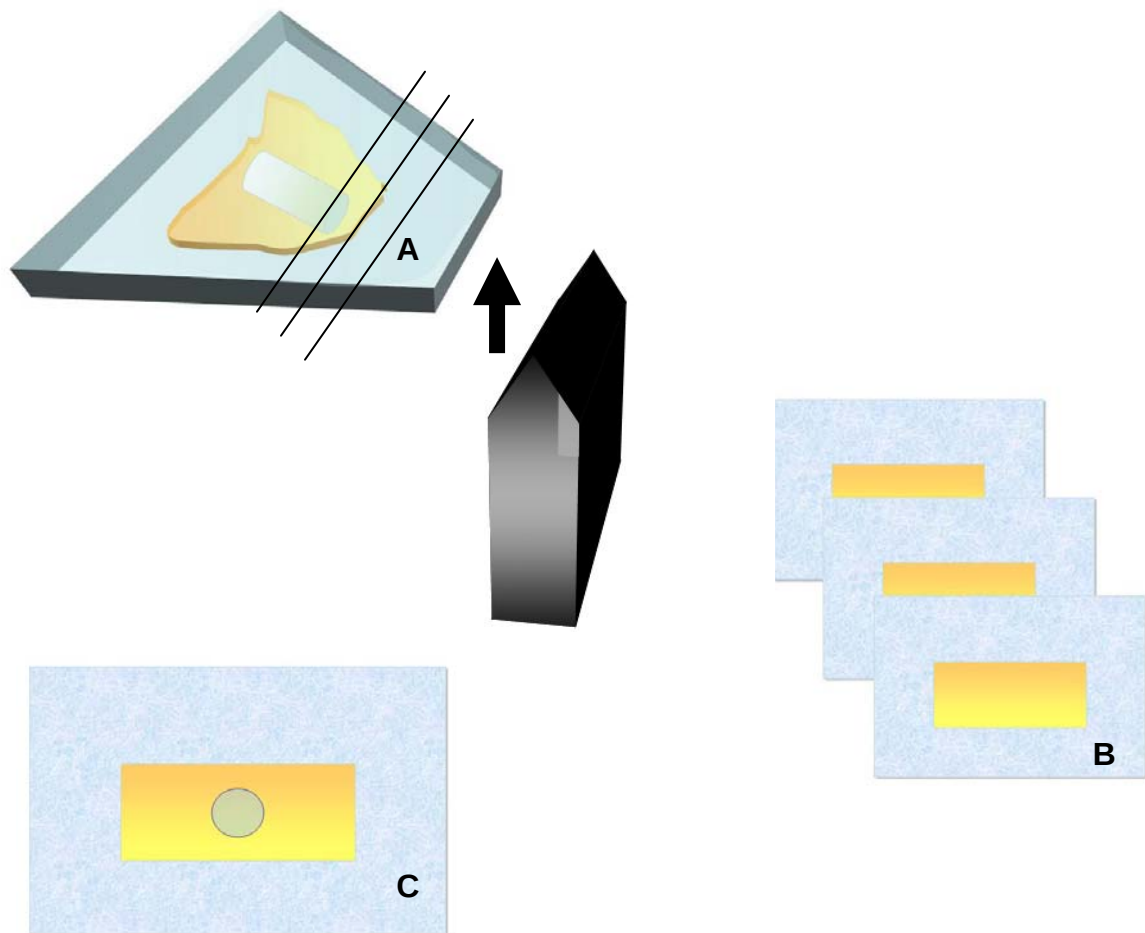
A – Aplicação do corante Azul de Evans pela veia lateral caudal do animal;
B – Aplicação das substâncias analisadas no tecido subcutâneo do animal, com auxílio de seringa de insulina de 1 mL;
C – Visão do tecido biopsiado contendo os halos azulados formados pelo extravasamento do corante.

PRANCHA 4 – Procedimentos cirúrgicos para implantação dos tubos de polietileno.



- A** – Incisão na linha sagital mediana e esquema da área divulsionada;
B – Colocação das substâncias testadas no interior dos tubos de polietileno de modo a não se observar bolhas em seu interior;
C – Colocação dos tubos no tecido subcutâneo dos animais;
D – Sutura da região dorsal do animal.

Prancha 5 - Esquema da realização dos cortes histológicos em micrótomo manual.



A – Esquema ilustrativo da posição do tubo de polietileno em relação ao bloco de parafina (perpendicular ao corte) e movimento de corte do micrótomo manual.

B – Cortes histológicos incluídos no estudo (sem a presença de vestígios do tubo de polietileno).

C – Corte histológico descartado do estudo (com a presença do tubo de polietileno).

5 RESULTADOS

5.1 CONTROLE DE QUALIDADE DAS FORMAS FARMACÊUTICAS

A Tabela 3 resume os resultados encontrados nos ensaios físico-químicos de pH e densidade desenvolvidos para o Gel Teste e para o Gel Poloxamer.

Tabela 3 - Análises físico-químicas para o Gel Teste e Gel Poloxamer. Média dos valores em triplicata

Gel	pH (Valores médios)	Densidade (Valores médios)
Gel manipulado na UEPG a base de lidocaína base (25 mg/g) e prilocaína base (25 mg/g) e excipiente a base de poloxamer 407 e 188	7,71	1,01949 g/mL
Gel placebo manipulado na UEPG com o mesmo excipiente do Gel Teste (poloxamer 407e 188)	7,63	1,01623 g/mL

A Tabela 4 resume os resultados encontrados no ensaio para determinação da viscosidade do Gel Teste e do Gel Poloxamer, em diferentes temperaturas.

Tabela 4 -. Análise da viscosidade para o Gel Teste e Gel Poloxamer. Médias dos valores em triplicata.

GRUPOS	TEMPERATURA AMBIENTE: 22° C			Média
Gel Teste	8,25	5,20	6,50	6,65
Gel Poloxamer	10,25	11,00	10,50	10,58
GRUPOS	TEMPERATURA 30° C			Média
Gel Teste	3,10	3,50	3,50	3,37
Gel Poloxamer	3,20	3,20	3,20	3,20
GRUPOS	TEMPERATURA 37° C			Média
Gel Teste	3,20	3,30	3,40	3,30
Gel Poloxamer	3,40	3,20	3,20	3,27
GRUPOS	TEMPERATURA 40° C			Média
Gel Teste	3,20	3,10	3,20	3,17
Gel Poloxamer	3,20	3,30	3,10	3,20

Em relação aos resultados referentes aos estudos microbiológicos, em nenhum dos meios de cultura utilizados observou-se crescimento bacteriano ou fúngico, tanto para o Gel Teste quanto para o Gel Poloxamer, após os períodos delimitados pelo fabricante do kit para averiguação desse tipo de crescimento microbiológico.

5.2 ESTUDO DO COEFICIENTE DE PARTILHA

Os resultados obtidos nos testes para a determinação do coeficiente de partilha estão apresentados na Tabela 5. Os valores estão sob a forma de log de P.

Tabela 5.- Valores dos testes para determinação do coeficiente de partilha das substâncias ativas (lidocaína e prilocaína).

Substâncias ativas	(log P)
Lidocaína	1,836
Prilocaína	2,021

5.3 ESTUDO DA ABSORÇÃO PERCUTÂNEA

5.3.1 Estudos in Vitro

5.3.1.1 Método do “Tape Stripping”

A Tabela 6 e 7 mostram os valores obtidos durante a confecção da curva de calibração para determinação do coeficiente de correlação (r) e a equação da reta para a lidocaína (Tabela 6) e prilocaína (Tabela 7). As curvas de calibração foram obtidas pela projeção, no eixo das abscissas (x), dos valores das concentrações de lidocaína (mol/L) e prilocaína (mol/L), e, no eixo das ordenadas (y), dos valores referentes à espectrofotometria obtidos para cada concentração de cada fármaco (Prancha 6 – A).

Tabela 6 – Parâmetros analíticos para a elaboração da curva de calibração da lidocaína.

Concentração de solução de lidocaína e álcool etílico absoluto (1×10^{-4})	Valores de absorbância
0	0,00000
1:9	0,09624
2:8	0,18657
3:7	0,25372
4:6	0,34723
5:5	0,42945
6:4	0,50627
7:3	0,59016
8:2	0,67555
9:1	0,75983
10	0,83154

Tabela 7 – Parâmetros analíticos para a elaboração da curva de calibração da prilocaína.

Concentração de solução de prilocaína e álcool etílico absoluto (1 x 10 ⁻⁴)	Valores de absorbância
0	0,000
1:9	0,059
2:8	0,118
3:7	0,184
4:6	0,222
5:5	0,271
6:4	0,321
7:3	0,37
8:2	0,425
9:1	0,450
10	0,523

Após terem sido confeccionadas as equações de reta para ambas as substâncias testadas esses valores foram interpolados em suas respectivas equações e transformados em gráficos que mostram a porcentagem da quantidade de cada substância aplicada que foi retida no estrato córneo após 1 minuto (Prancha 6 – B e C). Os valores referentes a estatística descritiva dos dados de absorção para a lidocaína e prilocaína para ambos os grupos do estudo estão relacionados na Tabela 14 (Apêndice), porém, os valores das porcentagens acumuladas estão mostrados em gráficos na Prancha 7 - A.

Não foram observadas diferenças significativas quando comparadas as substâncias ativas para os grupos (lidocaína: p= 0,644 e prilocaína: p= 0,364).
Teste t não pareado – P>0,05.

5.3.1.2 Células de difusão

A Tabela 8 mostra os valores obtidos durante a confecção da curva de calibração para determinação do coeficiente de correlação (r) e a equação da reta para a mistura eutética de lidocaína e prilocaína. A curva de calibração foi obtida pela projeção, no eixo das abscissas (x), dos valores das concentrações da preparação, em gramas, e, no eixo das ordenadas (y), dos valores referentes à espectrofotometria obtidos para cada concentração (Prancha 8 – A).

Tabela 8 - Parâmetros analíticos para a elaboração da curva de calibração da mistura eutética de lidocaína e prilocaína.

Valores da diluição da mistura eutética de lidocaína e prilocaína	Valores de absorvância
0,00000	0,000
0,00001	0,059
0,00002	0,118
0,00003	0,184
0,00004	0,222
0,00005	0,271

Os valores referentes a estatística descritiva dos dados de absorção para a mistura eutética estão relacionados na Tabela 15 (Apêndice), porém, os valores das porcentagens acumuladas estão mostrados em gráficos na Prancha 7-B. Após a equação de reta ter sido confeccionada, os valores de absorvância, medidos em espectrofotometria, foram interpolados nesta equação e transformados em gráficos que mostram a porcentagem da dose aplicada que foi resgatada após cada período de observação (Prancha 8 – B e C). Quando comparados os resultados entre os grupos não foi estabelecida diferença estatística significativa ($p=0,843$) Teste T não-pareado– $P>0,05$.

5.3.2 Estudos in Vivo

Para a determinação dos valores do percentual da dose das substâncias ativas aplicadas na mucosa bucal dos pacientes, as mesmas equações de reta para a técnica do tape stripping (in vitro) foram utilizadas, tendo em vista o comportamento similar dos fármacos envolvidos.

Da mesma maneira, os resultados foram interpolados em suas respectivas equações e transformados em gráficos que mostram a porcentagem acumulada da quantidade de cada substância aplicada que foi retida no estrato córneo após 1 minuto em uma média para os pacientes (Prancha 9 – A).

Os valores referentes a estatística descritiva dos dados de absorção para a mistura eutética estão relacionados na tabela 16 (Apêndice).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas após comparação da quantidade dos fármacos absorvida pelas camadas superficiais entre os grupos de estudo, sendo $p=0,601$ para a lidocaína e $p=0,183$ para a prilocaína. Teste T não-pareado– $P>0,05$.

5.4 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE

5.4.1 Estudo da permeabilidade vascular

Durante todo o período de pós – operatório, tanto para o experimento relacionado à permeabilidade vascular quanto para o que avaliou a resposta histológica em tecido subcutâneo, os animais apresentaram-se saudáveis e sem nenhum sinal de edema, supuração ou mesmo exposição dos tubos de polietileno.

As médias e o desvio padrão (DP) da área de extravasamento, em mm², do corante Azul de Evans na região subcutânea dorsal dos ratos, para cada grupo experimental, substâncias e tempos estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 - Médias e desvio padrão (DP) da área de extravasamento (mm²), do corante Azul de Evans na região subcutânea dorsal dos ratos, para cada grupo experimental, substâncias e tempos.

Tempos	Substâncias			
	Gel Teste	EMLA	Gel Poloxamer	Controle
3 horas	413,5 ± 281,2	339,9 ± 91,7	1,1 ± 2,5	0 ± 0
6 horas	452,6 ± 346, 1	330, 4 ± 165, 6	19,7 ± 17,8	0 ± 0
9 horas	382,6 ± 190,6	336,8 ± 50, 8	4, 6 ± 10,2	0 ± 0

Os resultados da reprodutibilidade dos dados para medições da área do halo de extravasamento do corante Azul de Evans mostrou um coeficiente de correlação intraclassa, com valor de $\alpha=0,9899$, considerado muito bom (Gráfico 1 – Apêndice). As comparações entre os grupos mostraram diferenças estatísticas significativas ($p<0,01$ – Kruskal-Wallis), sendo utilizado então o teste de Mann-Whitney para a comparação múltipla. Foram observadas diferenças entre GI (Gel Teste) e GII (EMLA[®]) quando comparados com GIII (Gel Poloxamer) e GIV (Controle) ($p<0,05$ – Mann-Whitney). Contudo, não foram observadas diferenças

entre os grupos quando a variável tempo foi analisada, como podemos observar na PRANCHA 10 - A.

As médias e o desvio padrão das medições da concentração do corante extravasado, em $\mu\text{g/mL}$, pelo método da espectrofotometria para todos os grupos experimentais estão relacionados na Tabela 10.

Tabela 10 - Médias e desvio padrão (DP) da medição da concentração do corante extravasado, em $\mu\text{g/mL}$, na região subcutânea dorsal dos ratos, para cada grupo experimental, substâncias e tempos.

Tempos	Substâncias			
	Gel Teste	EMLA	GelPoloxamer	Controle
3 horas	$0,71 \pm 0,43$	$0,83 \pm 0,32$	$0,13 \pm 0,17$	$0,05 \pm 0,05$
6 horas	$1,02 \pm 0,63$	$1,24 \pm 0,88$	$0,26 \pm 0,24$	$0,02 \pm 0,03$
9 horas	$2,18 \pm 1,60$	$1,64 \pm 0,76$	$0,04 \pm 0,09$	$0,13 \pm 0,20$

Na Prancha 10 – B, são ilustradas as médias da concentração do corante extravasado, mostrando um aumento em decorrência do tempo. Foram observadas diferenças estatísticas significativas considerando os grupos ($p < 0,0001$ – ANOVA de 2 critérios) e tempos ($p = 0,022$ - ANOVA de 2 critérios), porém, quando essas duas variáveis foram analisadas de maneira simultânea, não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,106$). O teste de Tukey revelou diferenças entre GI e GII ($p < 0,05$ – Tukey) quando comparados com GIII e GIV, bem como, entre os tempo de 3 e 9 horas ($p < 0,05$ – Tukey) para os mesmos grupos. Realizou-se uma correlação entre essas duas técnicas e os resultados mostraram uma associação positiva significativa para ambas, como está ilustrado na Prancha 11 - A.

5.4.2 Análise Histológica

2 DIAS

Durante a análise descritiva para os grupos de dois dias observamos que para o Grupo I (Teste) havia uma grande presença de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) e uma grande quantidade de vasos sanguíneos neoformados, conseqüentemente com grande exsudato inflamatório na região perivascular e infiltrado inflamatório presente em tecido conjuntivo, com presença de células inflamatórias dentro de tecido muscular. O Grupo II (EMLA[®]) apresentou características semelhantes ao Grupo I, porém com pequeno infiltrado inflamatório. Para o Grupo III (Placebo) observamos grande presença de células inflamatórias, principalmente células mononucleares dispersas e pequena quantidade de polimorfonucleares neutrófilos, uma grande quantidade de vasos sanguíneos com um moderado exsudato inflamatório (edema) na região perivascular, porém, sem um infiltrado inflamatório para dentro de tecido adjacentes de forma relevante. Para o Grupo IV (Controle) não havia presença de células inflamatórias, com pequena quantidade de vasos sanguíneos em tecido subcutâneo e ausência de edema e infiltrado inflamatório (Prancha 12 – A, B, C e D).

5 DIAS

A análise histológica para os animais com 5 dias revelou que para o Grupo I (Teste) uma diminuição na quantidade de células inflamatórias e dos vasos sanguíneos neoformados, mostrando uma redução do processo inflamatório agudo, contudo pudemos observar que ainda havia leve presença de exsudato inflamatório,

ainda adjacente à região perivascular e pequena infiltração de células inflamatórias em regiões próximas a implantação do tubo. Para o Grupo II (EMLA[®]) em contrapartida, ainda existia uma grande quantidade de células inflamatórias presente e também de vasos sanguíneos, porém, com pequena presença de edema e infiltrado inflamatório. Para o Grupo III (Placebo) resultados similares ao Grupo II foram observados e para o Grupo IV (Controle) pode-se notar uma ausência de células inflamatórias, bem como, de edema e infiltrado na região de implantação do tubo, porém com uma maior quantidade de vasos sanguíneos neoformados quando em comparação com os animais de 2 dias (Prancha 13 – A, B, C e D).

15 DIAS

Durante a análise descritiva dos animais de 15 dias observou-se para o Grupo I (Teste) pequena quantidade de células inflamatórias e vasos sanguíneos, com grande presença de células fibroblásticas, com um exsudato inflamatório pequeno, bem como, o infiltrado inflamatório para dentro dos tecidos adjacentes. Para o Grupo II (EMLA[®]) pelo contrário, pode-se observar grande presenças de células inflamatórias, caracterizadas principalmente como histiócitos, uma grande quantidade de vasos sanguíneos e grande presença de edema e infiltrado inflamatório no tecido subcutâneo dos animais. O Grupo III (Placebo) mostrou pequena quantidade de células inflamatórias e de vasos sanguíneos, pouco edema e pequeno infiltrado inflamatório. O Grupo IV (Controle) manteve-se inalterado por todo o período do estudo, isto é, com ausência de células inflamatórias, edema e infiltrado inflamatório e pequena quantidade de vasos sanguíneos (Prancha 14 – A, B, C e D).

As Tabelas 11, 12 e 13 resumem os resultados obtidos durante a análise descritiva dos cortes histológicos.

Tabela 11 – Análise descritiva (Qualitativa- 2 dias).

GRUPOS	Presença de células inflamatórias	Edema	Presença de vasos sanguíneos	Infiltrado inflamatório
GRUPO I	em grande quantidade	perivascular intenso	em grande quantidade	presente até o tec. Conjuntivo
GRUPO II	em grande quantidade	perivascular intenso	em grande quantidade	pequeno
GRUPO III	em grande quantidade	moderado	em grande quantidade	pequeno
GRUPO IV	ausência	ausência	em pequena quantidade	ausência

Tabela 12 – Análise descritiva (Qualitativa- 5 dias).

GRUPOS	Presença de células inflamatórias	Edema	Presença de vasos sanguíneos	Infiltrado inflamatório
GRUPO I	moderada	pequeno	moderada	pequeno
GRUPO II	em grande quantidade	pequeno	em grande quantidade	pequeno
GRUPO III	Em grande quantidade	pequeno	em grande quantidade	pequeno
GRUPO IV	ausência	ausência	em pequena quantidade	ausência

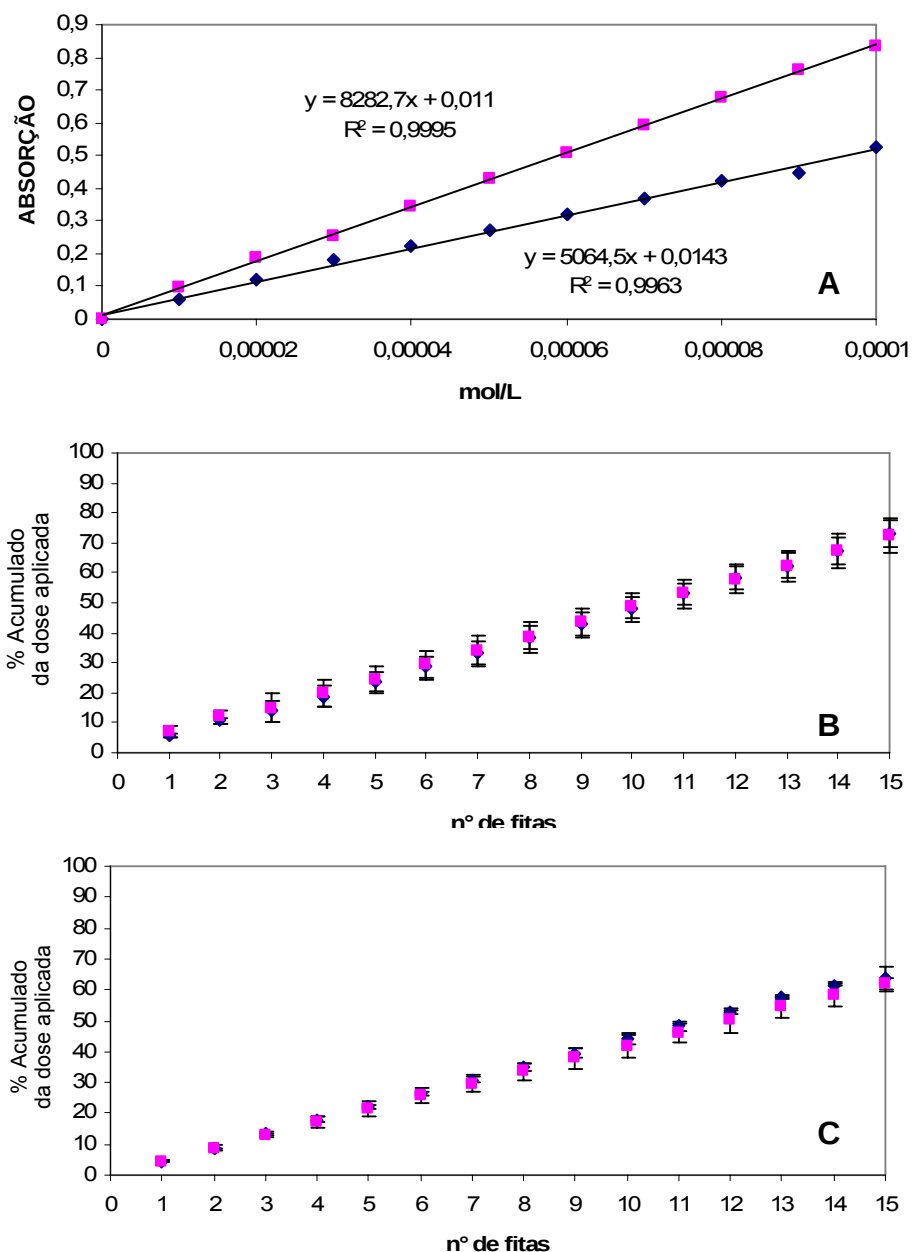
Tabela 13 – Análise descritiva (Qualitativa- 15 dias).

GRUPOS	Presença de células inflamatórias	Edema	Presença de vasos sanguíneos	Infiltrado inflamatório
GRUPO I	em pequena quantidade	pequeno	em pequena quantidade	pequeno
GRUPO II	Em grande quantidade	perivascular intenso	em grande quantidade	pequeno
GRUPO III	em pequena quantidade	pequeno	em pequena quantidade	pequeno
GRUPO IV	ausência	ausência	em pequena quantidade	ausência

Nessa etapa efetuou-se também a atribuição de escores à reação inflamatória causada pela presença das substâncias testadas, quando essas ficaram em contato com o tecido subcutâneo dos animais no interior dos tubos de polietileno

(Análise Semi-quantitativa). Os resultados foram comparados considerando cada um dos tempos de observação, seus respectivos tratamentos e valores de escores. Nenhuma diferença estatística significativa foi observada para os grupos nos períodos de 2 ($p=0,124$) e 5 dias ($p=0,214$). As figuras A e B, da Prancha 15, demonstram o percentual dos escores para os tratamentos realizados em cada período de observação. Para o período de 15 dias existiram diferenças entre os valores de escores para os tipos de tratamento, com $p = 0,001$. Para a comparação entre os tipos de tratamento foi utilizado o teste de Mann-Whitney e foram observadas diferenças entre GII e todos os outros grupos, bem como, diferenças entre GI e GIII quando comparados com GIV, porém sem diferenças entre ambos. Esses resultados estão representados na PRANCHA 15 – C.

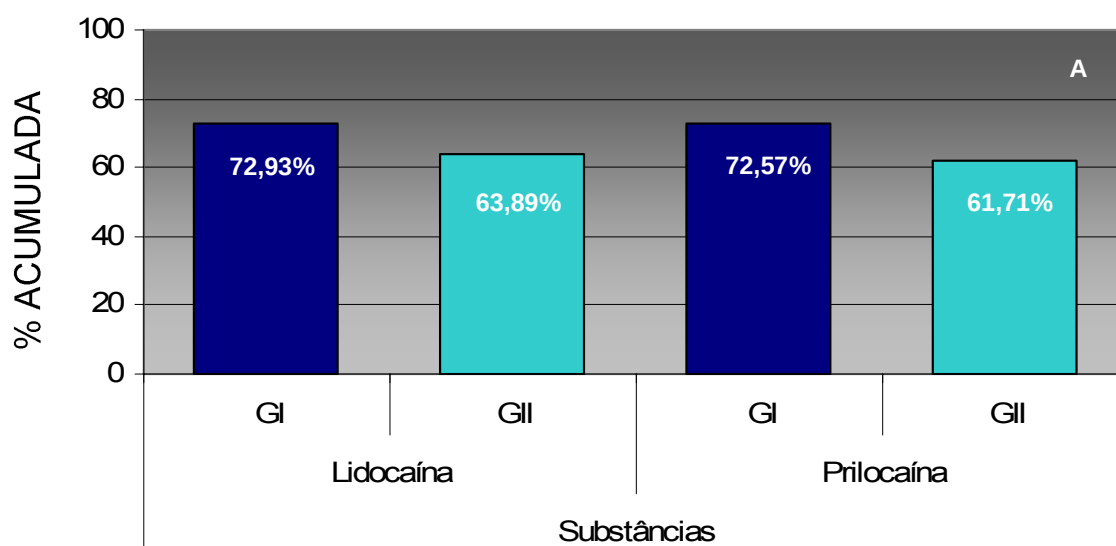
Prancha 6 – Gráficos das curvas de calibração para lidocaína e prilocaína e gráficos dos resultados encontrados pela interpolação dos resultados em suas respectivas equações de reta.



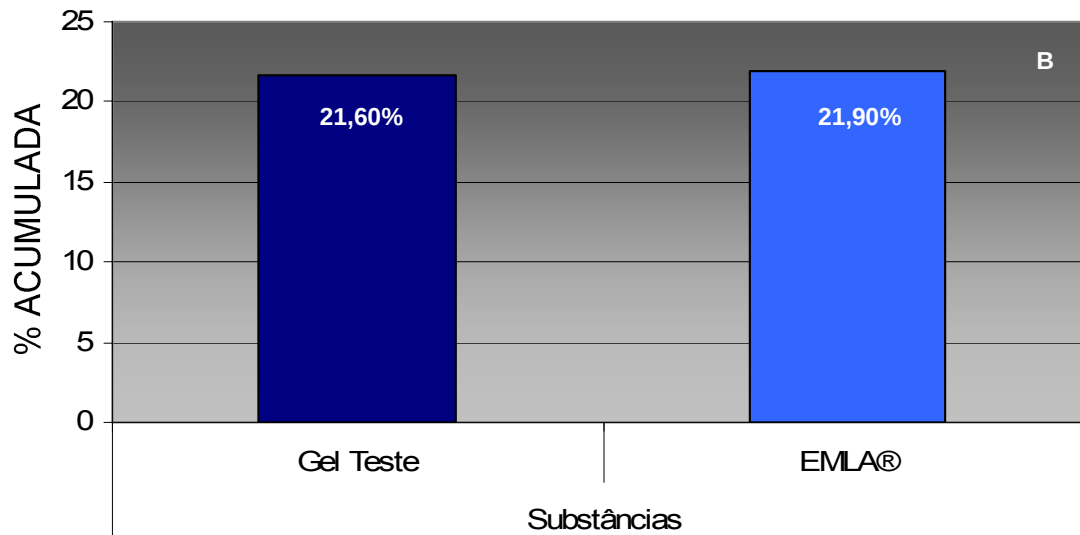
A - Curvas de calibração para a lidocaína (em rosa) e prilocaína (em azul), em comprimento de onda (λ) de 220 nm e 240 nm, respectivamente.

B e C - Curva dos valores de absorção em mol/L de lidocaína (em azul) e prilocaína (em rosa) após a aplicação do Gel Teste (B) e EMLA® (C) sobre a pele. Diferenças não significativas entre os grupos I “versus” II para Lidocaína e Prilocaína (respectivamente $p = 0,644$ e $p = 0,364$). Teste t não pareado – $P > 0,05$.

Prancha 7 – Gráficos dos valores das porcentagens acumuladas para a lidocaína e prilocaína nos grupos, obtidas na realização do método do “Tape Stripping” para a avaliação da absorção percutânea e para o método de células de difusão (in vitro).



Lidocaína – GI x GII – diferenças não significativas – $p=0,644$ (Teste T não pareado)
 Prilocaína – GI x GII – diferenças não significativas – $p=0,364$ (Teste T não pareado)

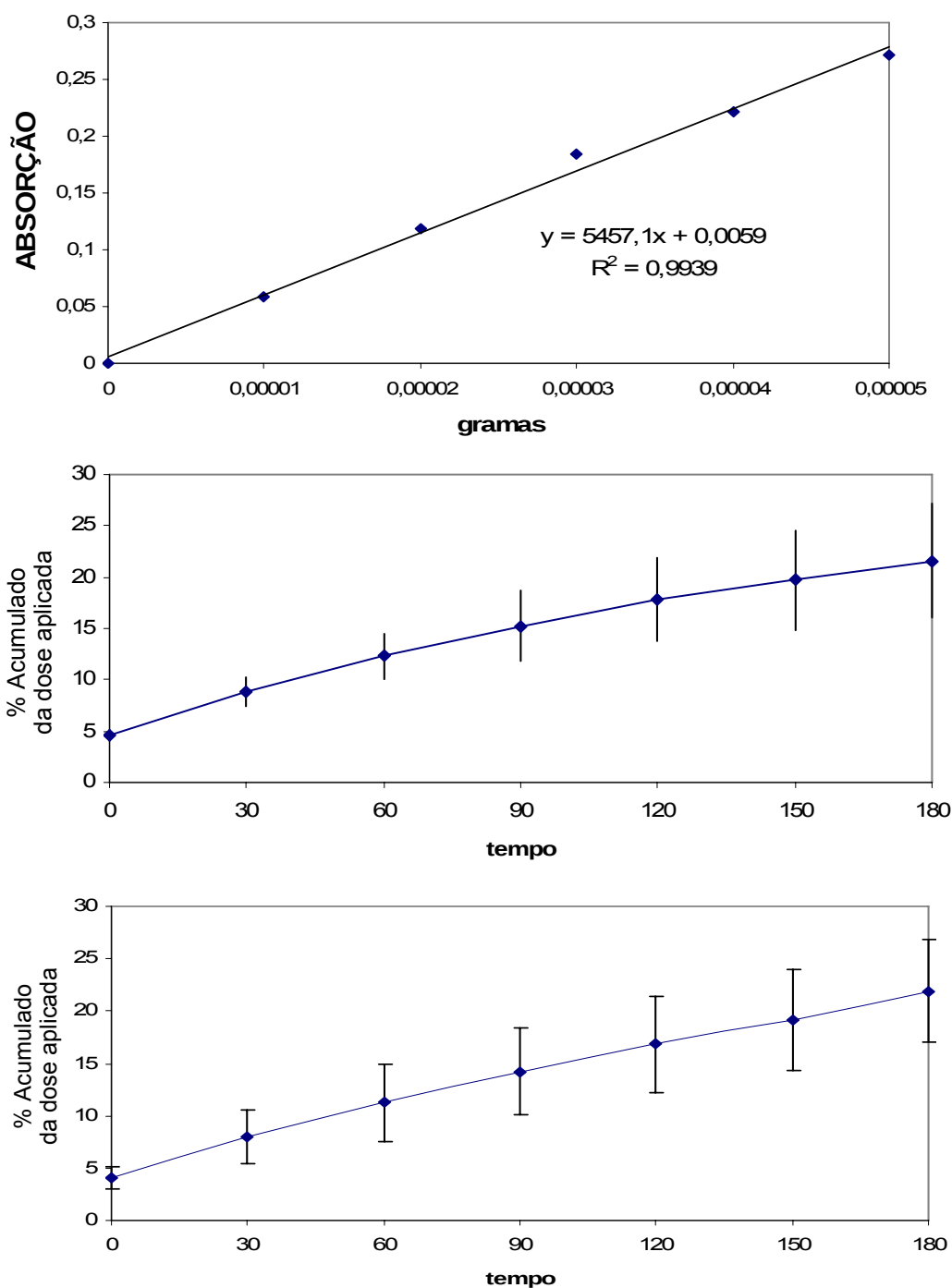


GI x GII – diferenças não significativas – $p=0,843$ (Teste T não pareado)

A – Gráfico dos valores das porcentagens acumuladas para a lidocaína e prilocaína nos grupos I e II.

B – Gráfico dos valores das porcentagens acumuladas para os grupos I e II pelo método de células de difusão.

Prancha 8 – Gráficos das curvas de calibração para a mistura eutética de lidocaína e prilocaína e seus respectivos resultados após interpolação dos dados na equação de reta.

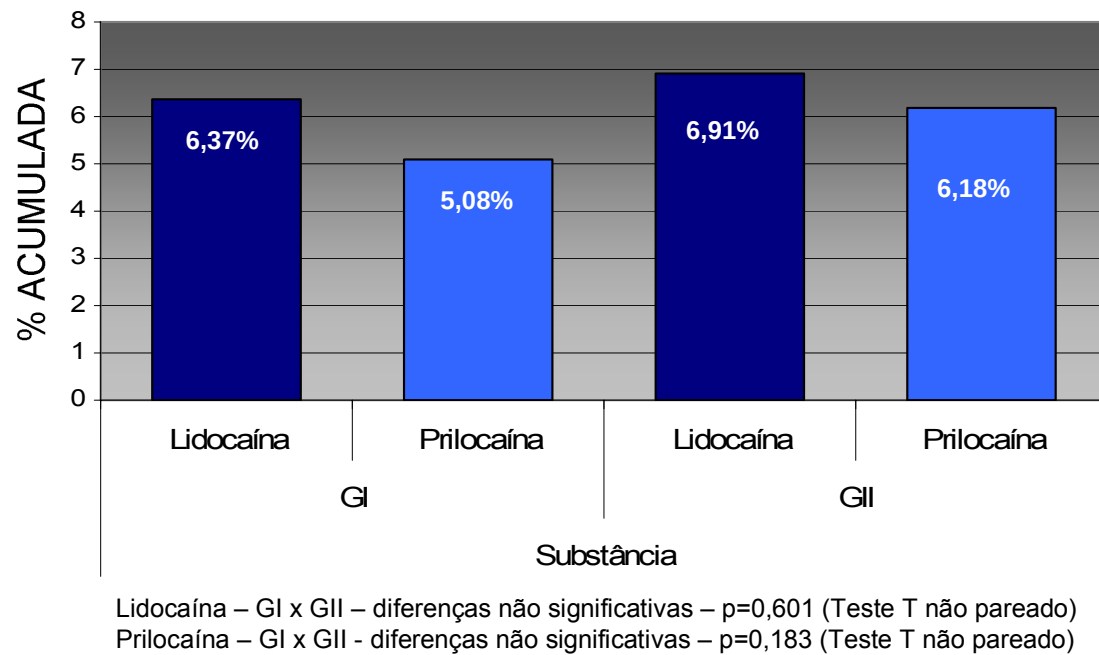


A - Curva de calibração para a mistura eutética de lidocaína e prilocaína.

B – Curva dos valores de absorção para a mistura eutética de lidocaína e prilocaína após aplicação do Gel Teste em decorrência do tempo (minutos).

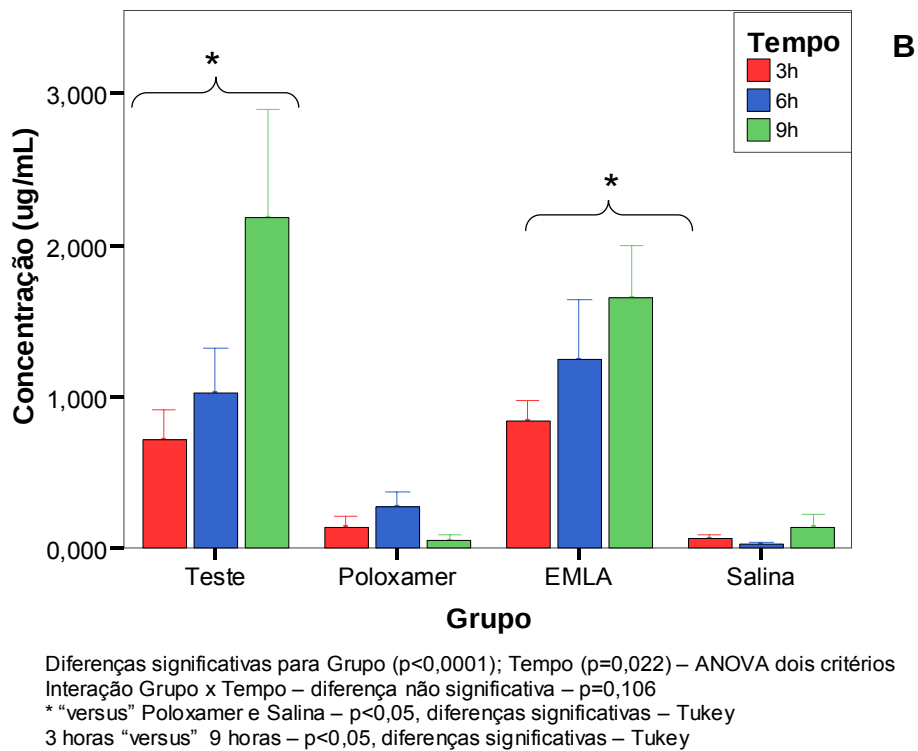
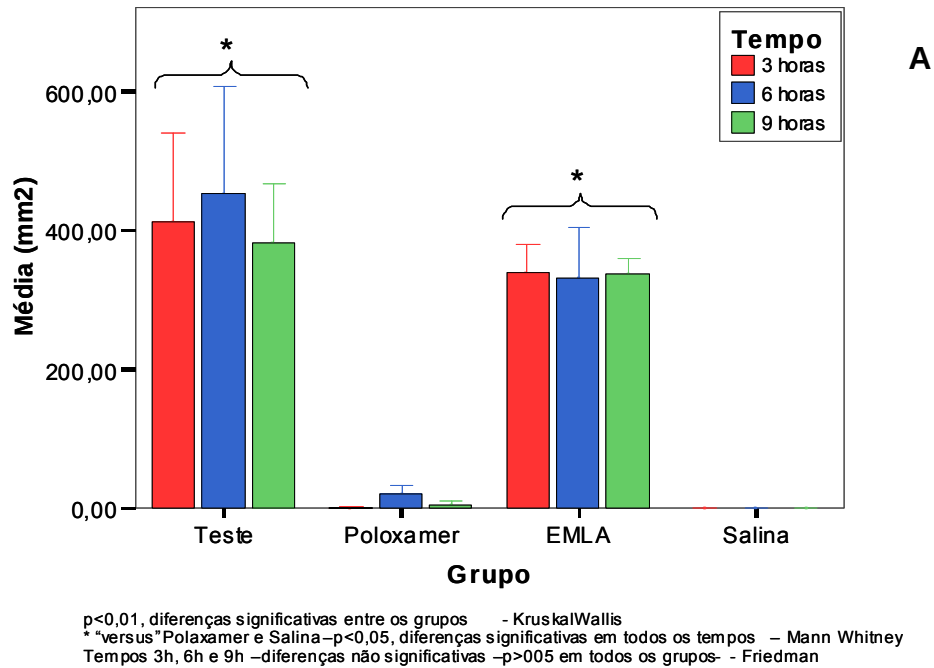
C – Curva dos valores de absorção para a mistura eutética de lidocaína e prilocaína após aplicação do EMLA[®] em decorrência do tempo (minutos).

Prancha 9 – Gráficos dos valores de “Tape Stripping” do estudo realizado em humanos.



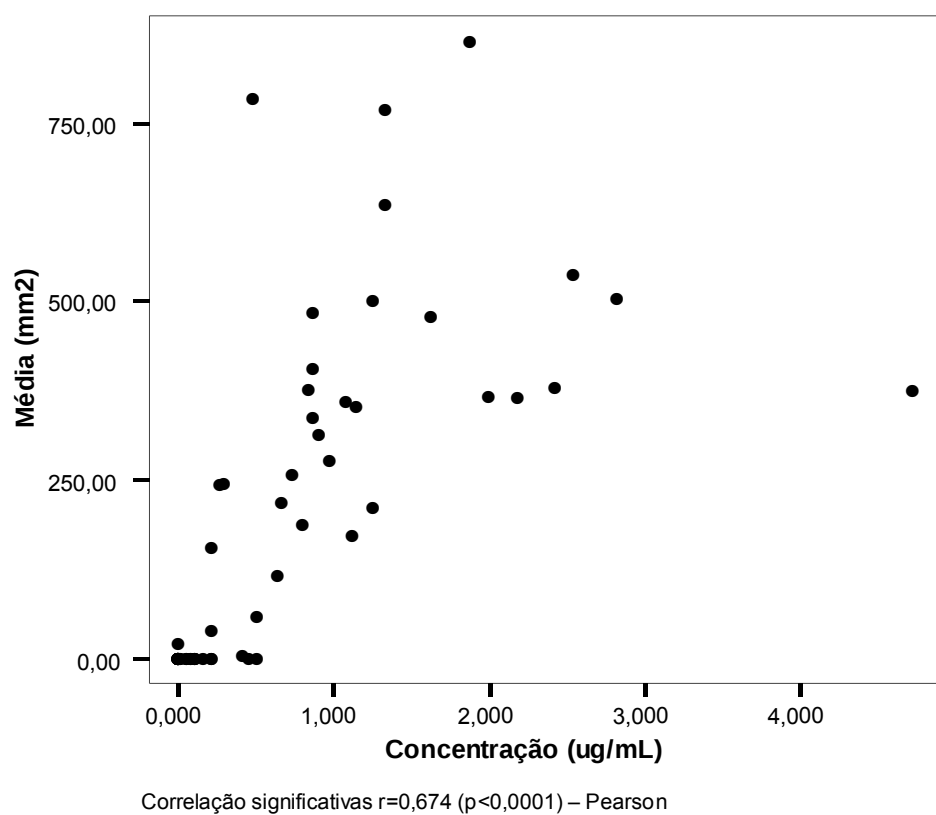
A – Gráfico dos valores obtidos, em porcentagem acumulada de dose aplicada, após a aplicação do Gel Teste e EMLA[®], pelo período de 1 minuto, em mucosa bucal. Lidocaína (GI) = 6,37/ (GII) = 6,91. Prilocaina (GI) = 5,08/ (GII) = 6,18.

PRANCHA 10 – Resultados da análise da permeabilidade vascular.



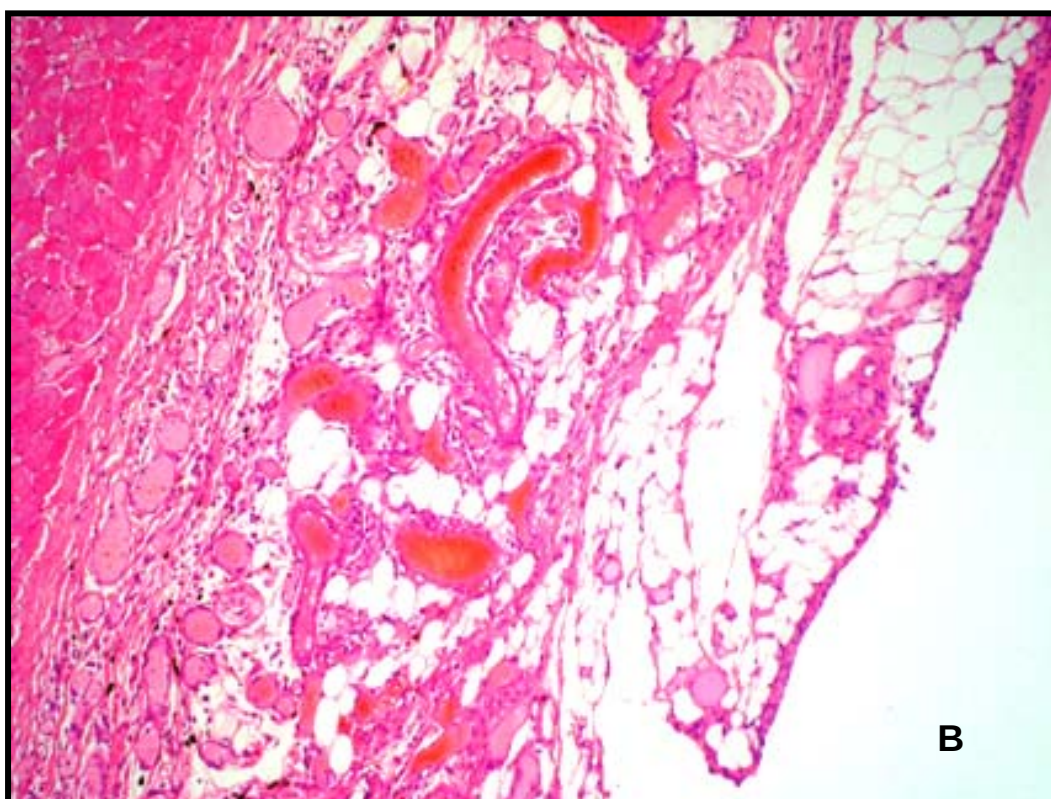
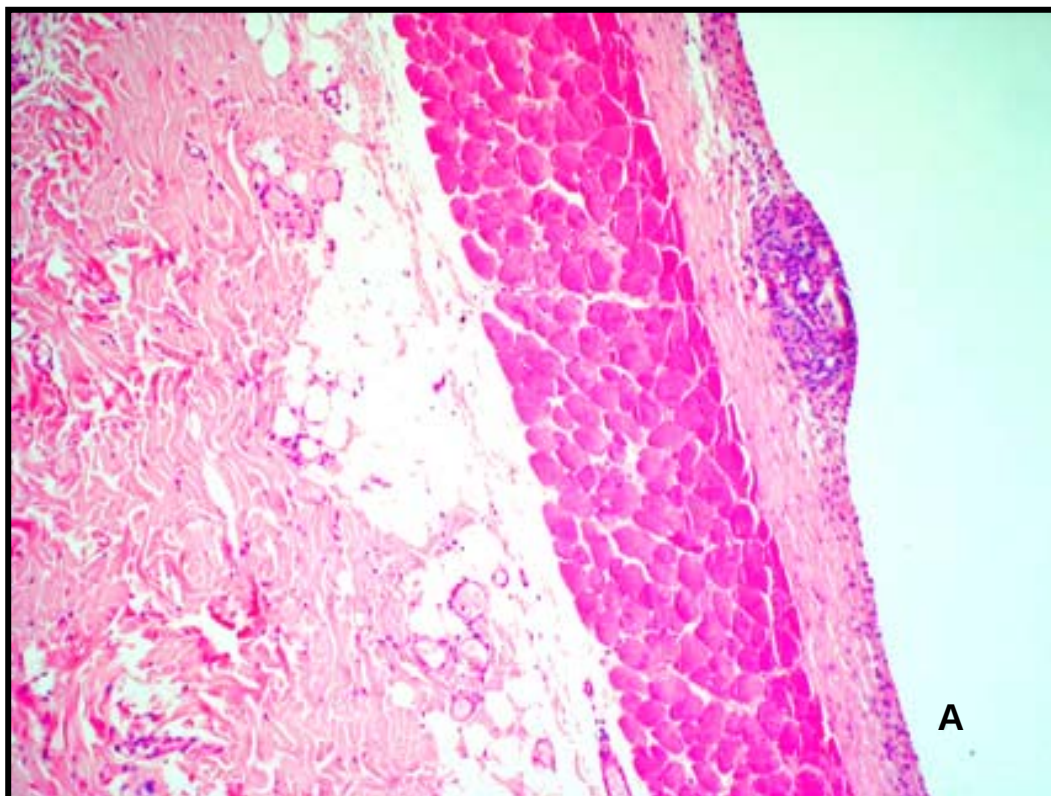
A – Avaliação da permeabilidade vascular através da mensuração do extravasamento do vascular do azul de Evans (Média e Erro Padrão);
B – Avaliação da permeabilidade vascular através da concentração de azul de Evans (Média e Erro Padrão).

PRANCHA 11 - Resultados da análise da permeabilidade vascular.



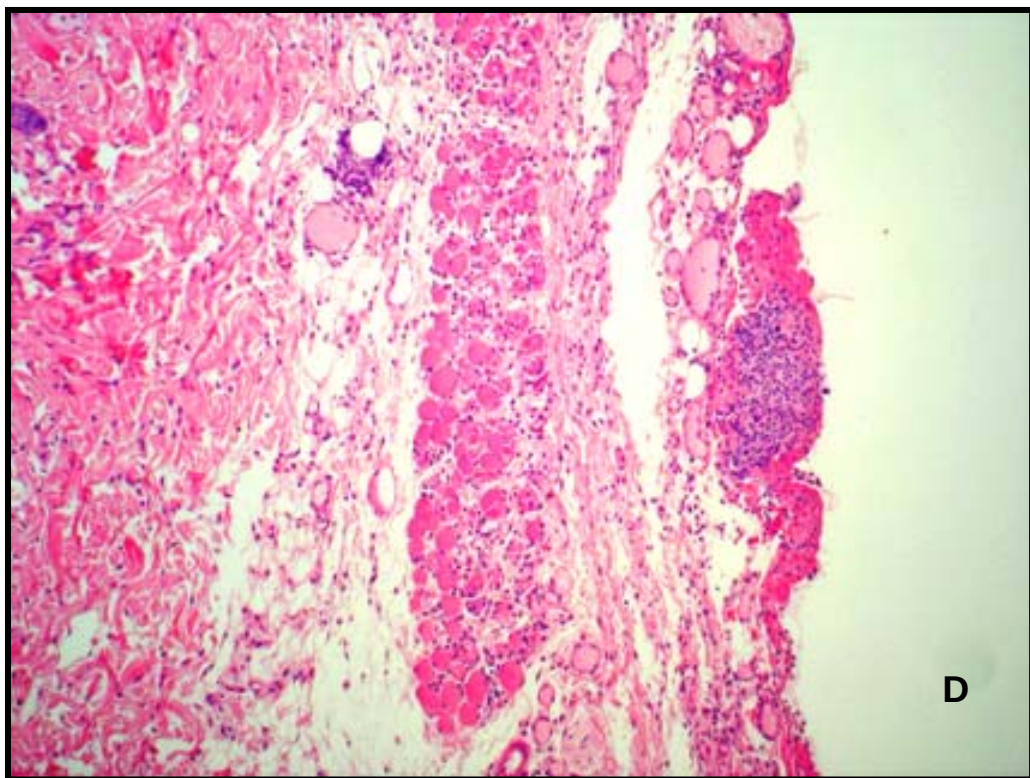
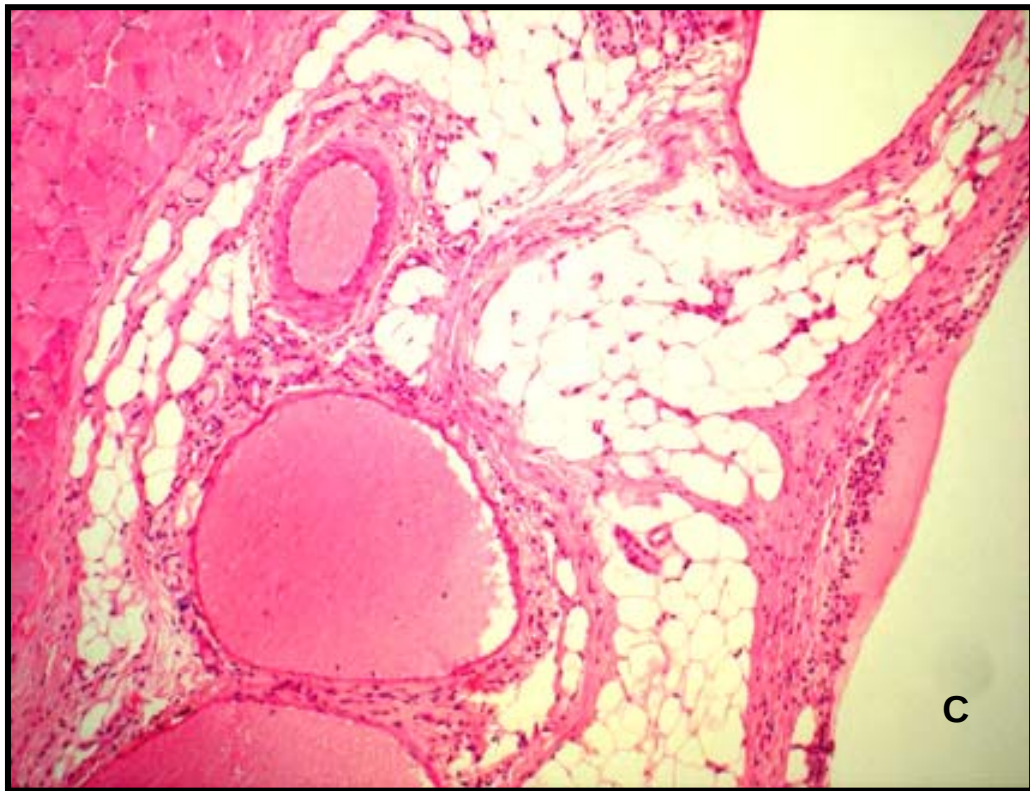
A - Relação entre as medições dos halos (mm^2) com a concentração de azul de Evans no tecido.

PRANCHA 12 – Lâminas histológicas para o período de 2 dias.



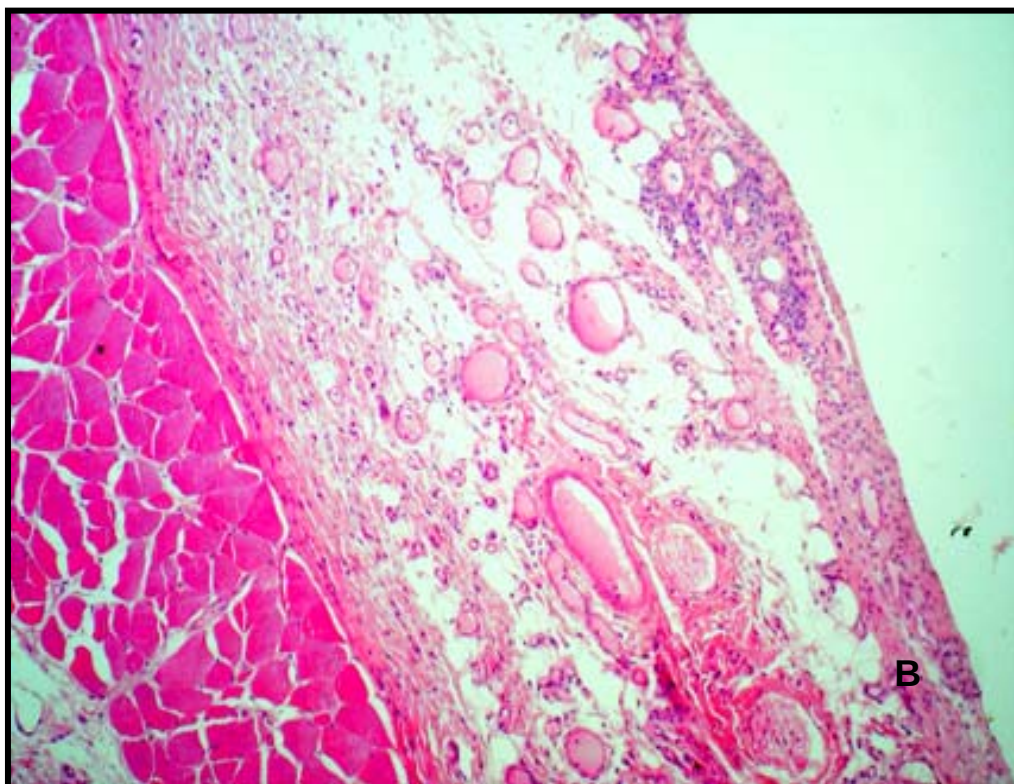
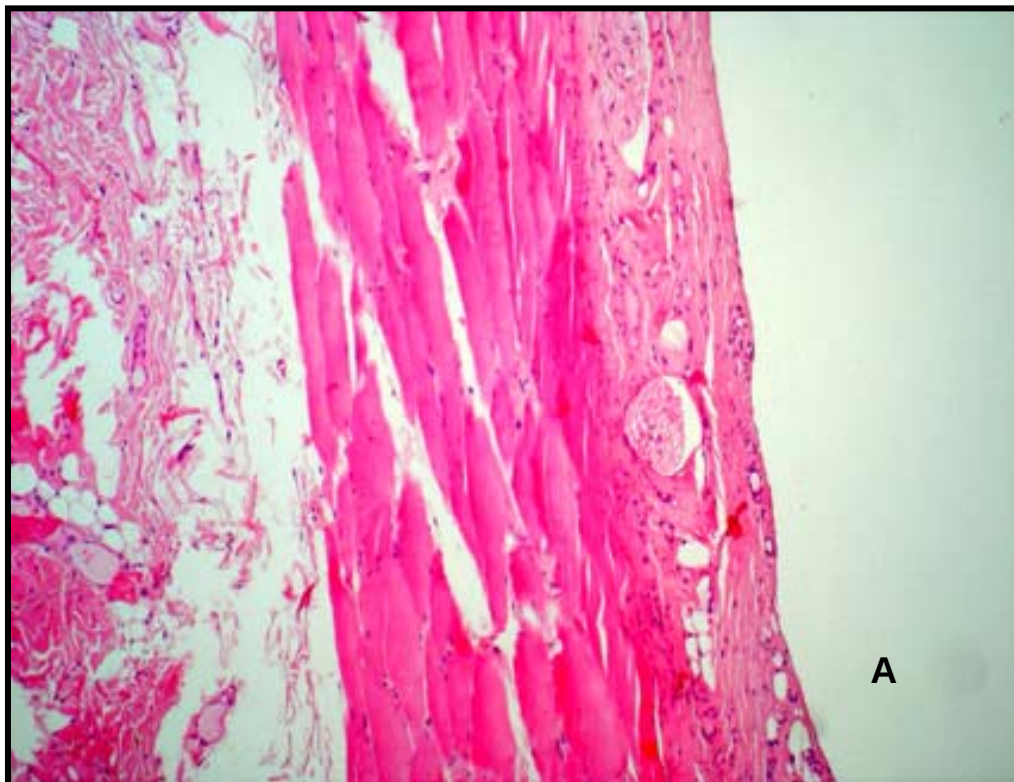
A - Corte histológico do grupo Controle - 2 dias – HE – 100 x.

B - Corte histológico do grupo Poloxamer - 2 dias – HE – 100 x.



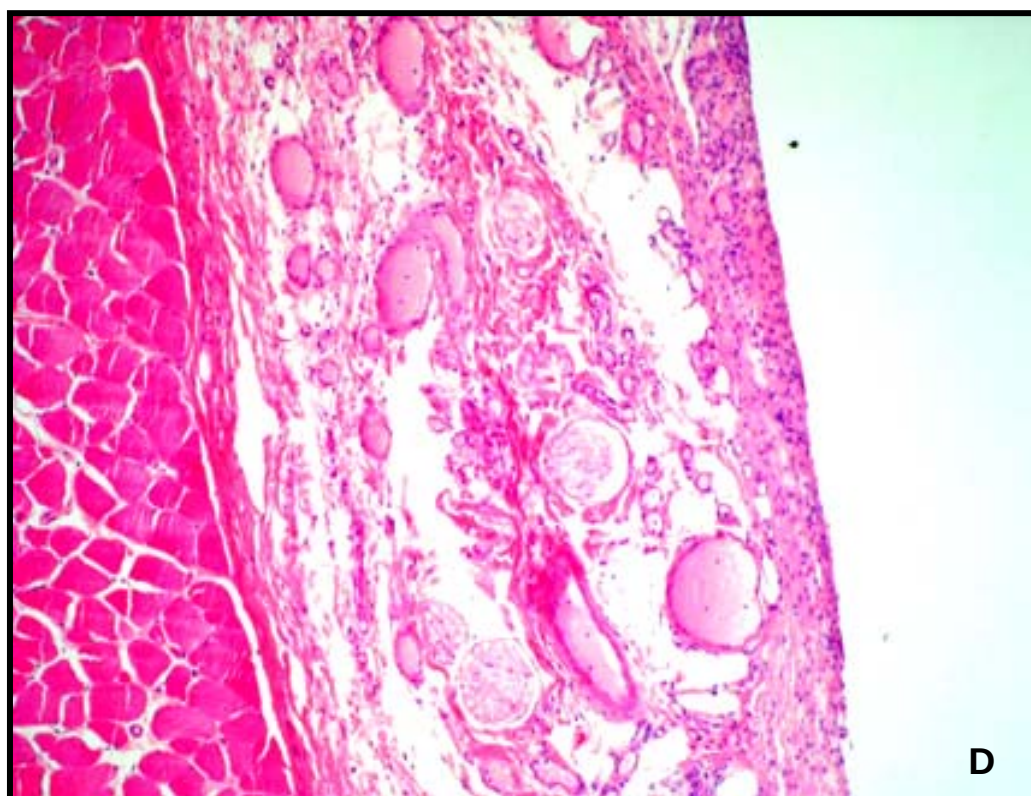
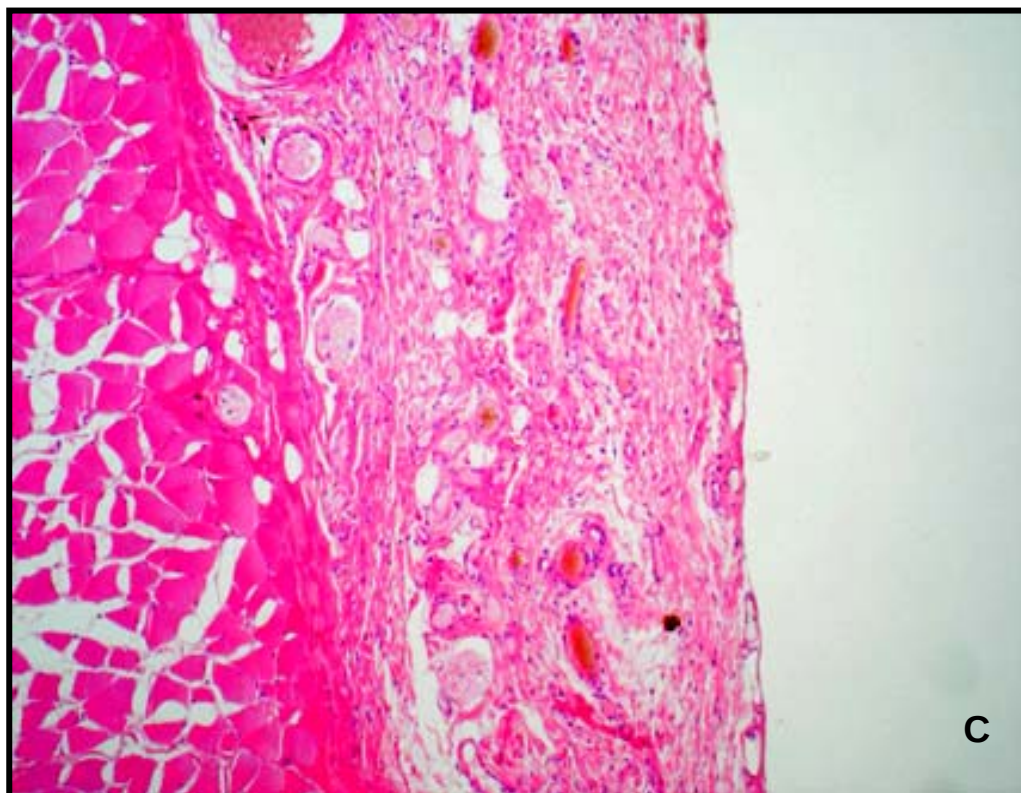
C - Corte histológico do grupo EMLA - 2 dias – HE – 100 x.
D - Corte histológico do grupo Teste - 2 dias – HE – 100 x.

PRANCHA 13 – Lâminas histológicas para o período de 5 dias.



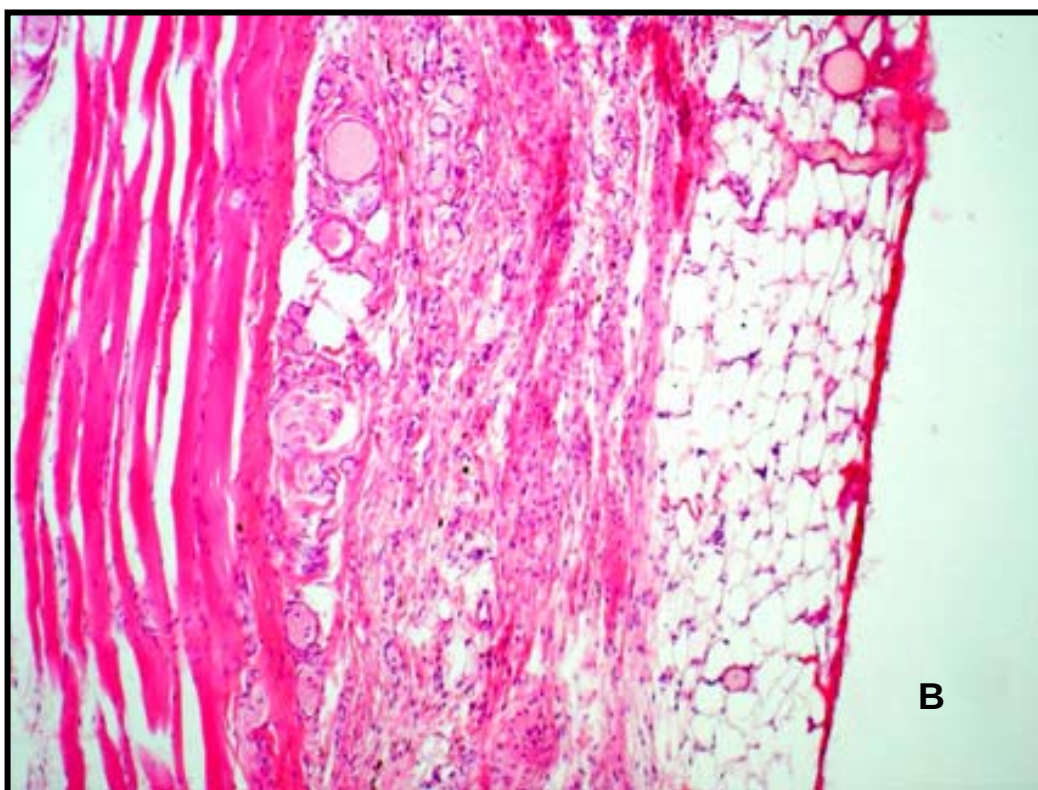
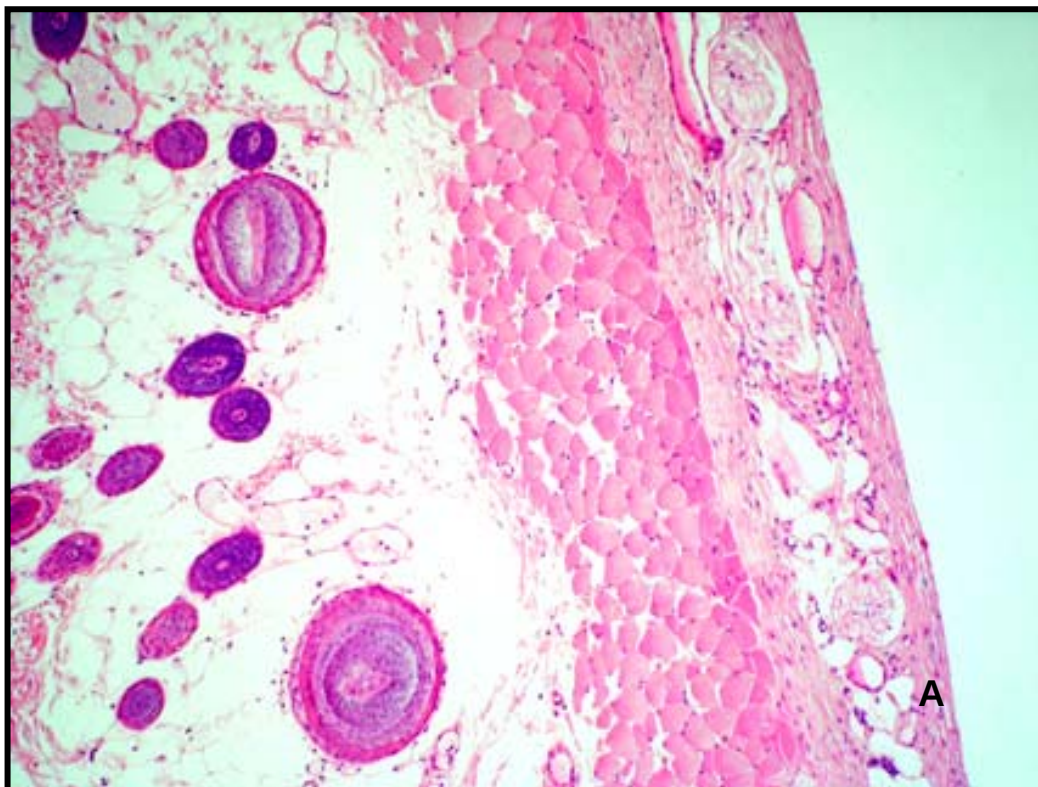
A - Corte histológico do grupo Controle - 5 dias – HE – 100 x.

B - Corte histológico do grupo Poloxamer - 5 dias – HE – 100 x.



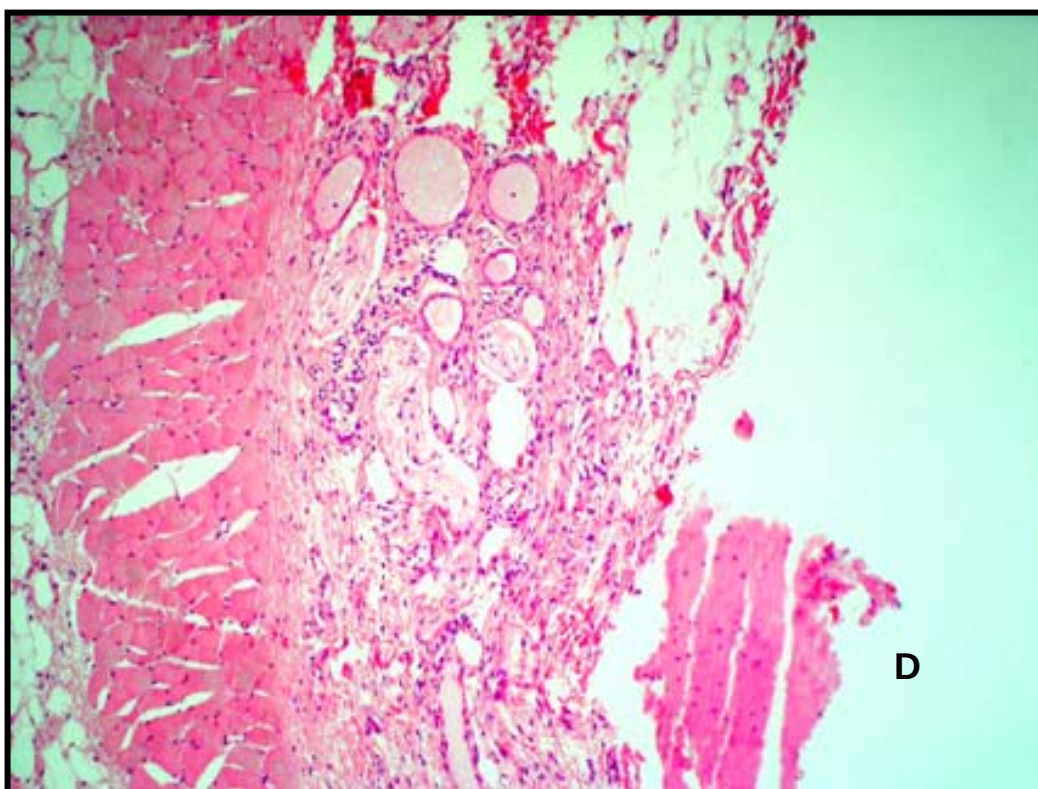
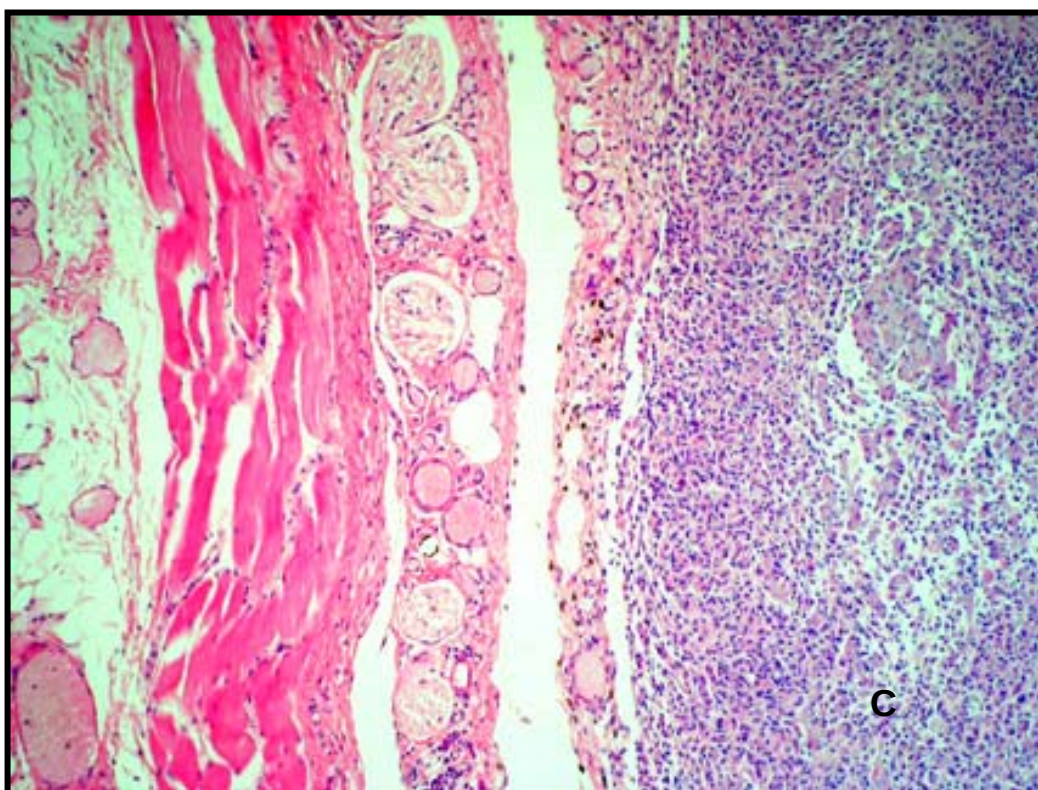
C - Corte histológico do grupo EMLA - 5 dias – HE – 100 x.
D - Corte histológico do grupo Teste - 5 dias – HE – 100 x.

PRANCHA 14 - Lâminas histológicas para o período de 5 dias.



A - Corte histológico do grupo Controle - 15 dias – HE – 100 x.

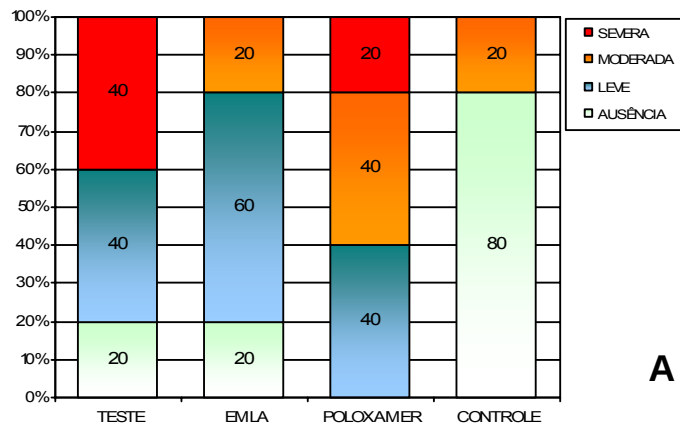
B - Corte histológico do grupo Poloxamer - 15 dias – HE – 100 x.



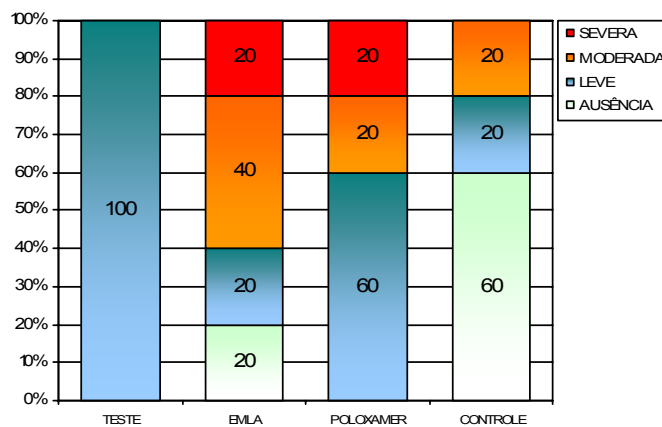
C - Corte histológico do grupo EMLA - 15 dias – HE – 100 x.

D - Corte histológico do grupo Teste - 15 dias – HE – 100 x.

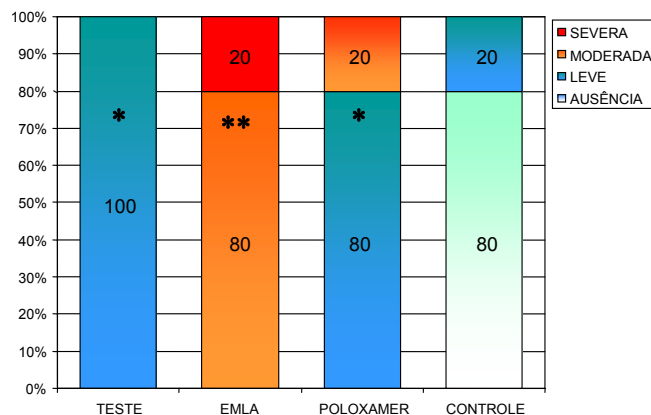
PRANCHA 15 – Resultados da análise dos escores de inflamação referente aos tempos de observação de 2, 5 e 15 dias. Valores em percentual.



A



B



C

A - Frequência de escores para o período de observação de 2 dias. Não significativo ($p = 0,124$).

B - Frequência de escores para o período de observação de 5 dias. Não significativo ($p = 0,214$).

C - Frequência de escores para o período de observação de 15 dias. * “versus” CONTROLE ($p = 0,032$) e ** “versus” TESTE, POLOXAMER e CONTROLE ($p=0,001$).

6 DISCUSSÃO

Os copolímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de propileno (PEO-PPO-PEO), também conhecidos como poloxamers, têm sido freqüentemente estudados em aplicações farmacêuticas, como excipientes para a liberação de fármacos na região oral, parenteral, retal, ocular e tópica, em função da baixa toxicidade e disponibilidade comercial (Scherlund et al., 2000).

O estudo realizado por Donaldson et al. (2003) relata a utilização desse tipo de produto para o procedimento anestésico no tratamento da doença periodontal. Foi analisada a capacidade de um gel termosensível a base de poloxamer 407 e 188, lidocaína e prilocaína, em produzir anestesia dentro das bolsas periodontais. Os escores obtidos, por meio da utilização da escala visual analógica para análise de dor, mostrou uma maior efetividade para o gel testado quando comparado com o grupo placebo, considerando a redução da sensibilidade dolorosa durante o procedimento de raspagem.

A padronização das características físico-químicas e microbiológicas é extremamente importante para assegurar o efeito terapêutico adequado do medicamento (ANDRADE et al., 2005; GUEDES, 1987). Uma contaminação microbiana da forma farmacêutica pode, inclusive, levar a um agravamento da patologia em tratamento (AUTON, 2005).

Nas formulações orais, o parâmetro de pH é de elevada relevância. Para preparações aplicadas na mucosa bucal, indica-se um pH variando entre 5,5 e 8,0 (APPEL & REUS, 2003). Valores de pH abaixo de 5,5 podem provocar lesões ulcerativas e injúrias em contato com a mucosa bucal, além de possibilitar uma desestruturação da hidroxiapatita, que forma o esmalte e a dentina, favorecendo a

formação de cáries. Já quando se utilizam preparações com valores de pH superiores a 8,0, em contato com a mucosa bucal, podem ocorrer lesões ulcerativas e irritação no epitélio bucal. Isso justifica a necessidade da correção de pH empregada para o gel, reduzindo o pH para um valor de 7,80.

Além disso, um pH alto faz com que a lidocaína (pK_a 7,86) e a prilocaína (pK_a 7,89) (Scherlund et al., 2000) estejam menos ionizadas em água, atuando como solutos hidrofóbicos (lipofílicos), de maior absorção pela mucosa. Por outro lado, um produto com pH excessivamente baixo (menor que 5,5), faz com que os fármacos fiquem positivamente carregados, possibilitando que essas substâncias se comportem como tensoativos catiônicos solúveis em água, mas dificultando a absorção através da mucosa bucal.

O pH também influencia na geleificação da forma farmacêutica. Em pH mais elevado, próximo e acima do pK_a dos fármacos, pode ser verificado que o ponto de geleificação diminui com o aumento da concentração de lidocaína e de prilocaína presentes. A origem desse efeito é a presença de componentes hidrofóbicos que induzem a formação de micelas e causa um intumescimento micelar (ALEXANDRIDIS e HATTON, 1995). Em pH 5,0, por outro lado, o comportamento oposto é observado, ou seja, a temperatura de geleificação aumenta, com o incremento na concentração das substâncias ativas. Esse aspecto é bem interessante e pode indicar que os fármacos, nas suas formas ionizadas em função do pH, interagem com a porção PEO hidrofílica do polímero, de uma maneira similar à encontrada para tensoativos catiônicos de cadeia pequena. Pela introdução de cargas na cadeia polimérica, a solvência do polímero aumenta eficientemente (Goddard and Ananthapadmanabhan, 1993), resultando em um incremento na temperatura necessária à geleificação.

Essas observações são compatíveis com os resultados apresentados por estudos prévios sobre os efeitos dos componentes hidrofóbicos na formação do gel de copolímeros em bloco de PEO-PPO-PEO. Por exemplo, Malmsten and Lindman (1992) investigaram o processo de geleificação do Lutrol® F127 e descobriram que o *t*-butilbenzeno diminui a temperatura de geleificação para esse polímero. De maneira análoga, Gilbert et al. (1987) observaram que o ácido benzóico e os ésteres do ácido *p*-hidroxibenzóico causam um decréscimo na temperatura de geleificação dos blocos do copolímero e que, quanto mais hidrofóbico é o soluto, maior será este efeito na temperatura de geleificação.

De acordo com a literatura (Scherlund, 2000), a escolha de um pH próximo a 7,8 para um gel anestésico contendo polímeros termosensíveis possibilita um sistema com um ponto de geleificação entre a temperatura ambiente e a temperatura corporal, disponibilizando uma taxa de liberação inicial alta, tornando o gel adequado para o uso como anestésico bucal.

Com relação ao estudo de estabilidade, não foram observadas alterações significativas de pH para o Gel-Teste (7,71) e para o Gel Poloxamer (7,63), após 3 (três) meses da manipulação, assegurando a manutenção das propriedades necessárias ao uso indicado.

A respeito da densidade, observou-se que a incorporação da lidocaína e da prilocaína, na concentração total de 50 mg/g, não resultou em alteração considerável à densidade da formulação do Gel Teste em relação ao Gel Poloxamer, mantendo-se em valores próximos a 1,0 g/mL. Esses resultados para o Gel Teste, que apresentou densidade média de 1,01623 g/mL, estabelecem uma relação importante para a determinação do volume a ser administrado quando do

uso clínico, pois permitem a correlação entre a massa e o volume do gel presente, garantindo a dose adequada.

O ensaio de consistência, baseado no método de Panseri et al. (1979), fornece a medida do escoamento das formulações estudadas entre duas placas de vidro, sendo indicativo da viscosidade dessas formas farmacêuticas. Assim, quanto maior o diâmetro do halo formado, maior o escoamento e menor a viscosidade da preparação em estudo.

Analisando-se os valores apresentados na Tabela 4 para o Gel Teste e para o Gel Poloxamer, observou-se que a consistência (em cm) das formulações aumenta com a elevação da temperatura, sobretudo quando se compara a temperatura ambiente (22 °C) com as temperaturas mais altas (30, 37 e 40 °C). Esses dados estão de acordo com os achados de Scherlund, Malmsten, Brodin (1998), os quais afirmam que o uso dos copolímeros em bloco (PEO-PPO-PEO), como excipientes termosensíveis para géis, permite a formação de fluidos de baixa viscosidade na temperatura ambiente e géis elásticos rígidos na temperatura corporal. Essa característica é extremamente relevante ao uso em anestesia local, pois possibilita que a forma farmacêutica se mantenha no interior da bolsa periodontal, permitindo um maior contato das substâncias ativas com o tecido inflamado e possibilitando uma adequada liberação das mesmas, levando a ação nos receptores nociceptivos.

Outro aspecto interessante, é que o aumento da consistência do gel termosensível, em contato com a temperatura corporal, pode atuar como uma barreira na difusão do(s) fármaco(s) através da matriz polimérica, resultando na liberação modificada dos mesmos. Porém, essa afirmação deve ser considerada com cautela, uma vez que Miyazaki et al. (1984) revelam que quanto mais alta a

temperatura, maior é a liberação do fármaco da estrutura do gel, indicando que a liberação da substância ativa através da estrutura polimérica do excipiente é um processo dependente da energia, resultante do incremento da temperatura. O aumento da liberação com o aumento da temperatura sugere que as características de liberação do fármaco através da estrutura polimérica do gel deverá mudar de acordo com a variação da temperatura corporal (SHIN, CHO, YANG, 2004), como ocorre em processos inflamatórios.

Os valores para a consistência média de ambos os géis, nas temperaturas de 30, 37 e 40°C, podem ser considerados semelhantes. Porém, na temperatura ambiente (22 °C), a consistência do Gel Teste apresentou um valor superior à consistência do Gel Poloxamer.

Isso pode ser explicado baseando-se nos estudos de Scherlund, Malmsten, Brodin (1998) e Scherlund et al. (2000), os quais observaram que a geleificação do Lutrol® 127 é influenciada pela presença de substâncias ativas, como a lidocaína e a prilocaína, no fato de que a presença desses fármacos permitiu a formação de micelas oligoméricas, mesmo em temperaturas abaixo de 25 °C, e que essa informação deve ser levada em consideração, quando na escolha da concentração adequada do polímero.

De acordo com a literatura (Scherlund et al., 2000), outro fator que influencia na viscosidade do gel é a concentração de Lutrol® 127 e de Lutrol® F 68 presente no sistema, pois quanto maior a concentração de Lutrol® 127, menor será o ponto de geleificação, assim como, quanto maior a concentração de Lutrol® F 68, maior o ponto de geleificação.

Em relação ao controle de qualidade microbiológico de produtos não estéreis, nos quais admite-se a presença de carga microbiana limitada, o objetivo

imediatamente desta análise é comprovar a ausência de microrganismos patogênicos e determinar o número de microrganismos viáveis, em função da utilização do produto, por exemplo, para o uso oral. Deve-se ressaltar que carga microbiana elevada pode comprometer a estabilidade do produto, conseqüentemente, pode haver perda da eficácia terapêutica, por degradação do princípio ativo ou por alteração de parâmetro físico fundamental para a sua atividade, como é o caso do pH (ANDRADE et al., 2005).

Com relação aos resultados microbiológicos, verificados para o Gel Teste e para o Gel Poloxamer, não foram observados o crescimento fúngico e o bacteriano, encontrando-se, portanto, em conformidade com a legislação (BRASIL, 1999) que estabelece que produtos tópicos têm, como limites de aceitação, em termos de microrganismos aeróbios viáveis totais, não mais que 10^3 UFC/g ou mL, sendo o limite máximo de 5×10^3 UFC/g ou mL e ausência de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e coliformes totais e fecais. Esses achados revelam a eficiência do conservante empregado, quando da manipulação das formulações.

Entre os vários sistemas de liberação de fármacos, o de liberação percutânea tem sido amplamente empregado como um sistema avançado para este fim, possuindo várias vantagens no controle e manutenção das substâncias ativas de várias preparações de ação local (SHIN, CHO, YANG, 2004).

O método utilizado para a determinação do coeficiente de partilha das substâncias ativas estudadas foi aquele preconizado pela OECD (1995), que estabelece uma sensibilidade que varia entre valores de -2 e 4 validando os resultados obtidos neste estudo (2,021 para a lidocaína e 1,836 para a prilocaína).

Esses indicadores mostram uma característica de anfifilidade para ambas, isto é, significa que são moléculas que combinam propriedades hidrofílicas e lipofílicas (hidrofóbicas), o que é também citado em Scherlund et al. (2000).

Para uma melhor definição, podemos citar Wester e Maibach (1999), ao relatar que moléculas anfifílicas são caracterizadas por sua alta afinidade pelas fases lipofílicas, bem como pelas fases aquosas da estrutura estratificada do estrato córneo da pele e que em alguns momentos estão completamente misturados, tanto na fase oleosa quanto na aquosa.

Contudo, Vickers et al (1997), relataram que o valor do coeficiente de partilha para a lidocaína seria de 2,9 e para a prilocaína de 1,0, o que permitiria uma absorção mais rápida da lidocaína através da mucosa. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos para os testes de absorção percutânea (in vitro e in vivo), não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as duas substâncias ativas, considerando as quantidades que ultrapassaram as primeiras camadas epiteliais, sejam em pele humana ou em mucosa bucal.

Segundo Schaefer e Redelmeier (1996), é necessário que o solvente apresente uma boa correlação com absorção percutânea e, para tal, deve exibir um coeficiente de partilha similar, pois este valor reflete no coeficiente de permeabilidade. Esse critério é encontrado no octanol, que é o único com semelhança polar à barreira de difusão da pele. Assim, foi dada preferência ao octanol para a realização da fase oleosa do teste, uma vez que essa substância satisfaz as pressuposições técnicas sugeridas naquele estudo.

Segundo normativa técnica da OECD (1995) optou-se pelo uso da água destilada.

Para os testes de absorção percutânea foram avaliadas duas formas farmacêuticas, o Gel Teste (Grupo I) e o EMLA[®] (Grupo II), ambos anestésicos tópicos, sendo o segundo usado como produto de referência para comparação dos resultados (Scherlund et al., 2000).

Em suas aplicações em cavidade bucal, os anestésicos locais tópicos devem permanecer sobre a superfície da mucosa em sua forma não-ionizada e hidrofóbica, por um período de tempo adequado, para que possa penetrar no estrato córneo e, conseqüentemente, atuar nos receptores nociceptivos para inibir a sensibilidade dolorosa (SHIN, CHO, YANG, 2004).

É extremamente difícil prever os efeitos terapêuticos de fármacos incorporados às pomadas e cremes quando aplicados em cavidade bucal, pois, a umidade (saliva e fluido gengival), o movimento e contato de estruturas internas, como a língua, facilmente fazem a remoção dessas formas farmacêuticas.

Quando efetuada uma comparação clínica por meio de inspeção visual, durante a realização do método do “Tape Stripping” em humanos, foi observada uma maior adesividade do Gel Teste, quando comparado ao EMLA[®], à mucosa bucal. Isso pode ser explicado pelas características físico-químicas das as fórmulas farmacêuticas, sendo a primeira composta por um excipiente termosensível que se transforma em gel à temperatura corporal e, a segunda, composta em grande parte por substâncias oleosas, que como citado anteriormente, são facilmente removidas por simples limpeza mecânica. Para cavidade bucal, apesar dos resultados da porcentagem da dose acumulada para os fármacos constituintes das formulações não mostrarem diferenças significativas, seria mais indicado o uso do

Gel Teste, devido a sua maior adesividade à mucosa, ainda mais pelo fato de que sua indicação primordial é para o uso dentro de bolsas periodontais, as quais têm constante liberação de fluidos (fluido gengival) de maneira fisiológica, que é aumentada em condições de inflamação.

As técnicas in vitro para a mensuração da capacidade de fármacos penetrarem na pele são bastante variadas e úteis. Segundo Howes et al. (1996), durante o “Workshop” da ECVAM para avaliação dos métodos de absorção percutânea, foi concluído que, a técnica de células de difusão de uma câmara é um modelo bastante apropriado para esse tipo de estudo e que a pele humana é a membrana de escolha. Estando de acordo com a literatura pertinente, optamos pela escolha tanto do método, quanto da utilização da membrana, citados acima.

Contudo, alguns fatores podem alterar a taxa de absorção de determinadas formas farmacêuticas, tais como, a quantidade da dose aplicada, seu veículo e/ou excipiente, o tempo de aplicação, a localização anatômica, temperatura, pH, e coeficiente de partilha. Dentre eles, as características físico-químicas dos fármacos, parecem ser as que mais influenciam a absorção, porém, a quantidade da dose aplicada na superfície da pele ou da mucosa, também é um fator que está intimamente relacionada com a taxa de absorção das substâncias ativas.

Isso também foi observado neste estudo, pois, quando comparados os resultados da avaliação in vitro e in vivo, pelo método do “Tape Stripping”, para o primeiro obtiveram-se resultados da porcentagem da dose aplicada, após 1 minuto, em torno de 72% para o Grupo I e 62% para o grupo II, ressaltando que a quantidade das formulações colocadas sobre a superfície da pele foi de 250 mg. Por outro lado, para o segundo (experimento in vivo), onde foi aplicada uma quantidade menor das formulações sobre a mucosa (60 mg), foram observados resultados da

porcentagem da dose aplicada significativamente menores, em torno de 9%, para os grupos. Segundo Junginger, Hoogstraate e Verhoef (1999) a baixa permeabilidade da mucosa bucal, também pode ter influenciado nestes resultados. Katchburian e Arana (1999) relatam, contudo, que a estrutura histológica da mucosa bucal e da pele é bastante parecida, inclusive continuam a apresentar células semelhantes às encontradas nas camadas superficiais da pele, sendo, denominada como estrato superficial. Esse resultado pode ter sido influenciado também em função do menor número de amostras obtidas nas extrações da mucosa bucal, devido ao menor número de camadas daquela estrutura (5 tapes), enquanto que, da pele, puderam ser obtidas 15 amostras, o que pode ter permitido uma recuperação maior do fármaco, sugerindo um melhor índice de absorção.

A diferença entre as quantidades das preparações utilizadas no estudo, fundamentou-se na literatura científica e na prática clínica. Shin, Cho, Yang (2004), na sua pesquisa, utilizaram 500 mg da formulação farmacêutica. Scherlund et al. (2000) utilizaram 1 g de uma forma farmacêutica similar à usada neste estudo para os testes de absorção. Vickers et al. (1997) usaram 8 mg de EMLA[®] para mensuração da quantidade de lidocaína e prilocaína absorvida em plasma. Neste estudo tentou-se reproduzir o mais fielmente possível a prática clínica, considerando a quantidade do produto utilizado em cavidade bucal, porém, sem desviar-se do caráter científico. Portanto, nos estudos in vitro preferiu-se utilizar quantidades semelhantes às descritas anteriormente (250 mg), com exceção ao estudo de absorção em células de difusão, cuja normativa técnica (OECD, 2004) prevê o uso de uma dose, a mais próxima da realidade clínica (60 mg). Relevante acrescentar que, em humanos, é impraticável o uso de grandes quantidades de produto, uma

vez que a região indicada para o uso (o interior da bolsa periodontal) mede apenas alguns milímetros (4 a 12 mm).

Qualquer agente que induza a certo tipo de reação inflamatória é denominado como agente flogógeno. Uma injúria química ocorre quando um tecido vital é exposto a soluções não compatíveis com o metabolismo celular. A fase inicial da resposta inflamatória é caracterizada por uma vasodilatação, um aumento da permeabilidade vascular e da migração celular. Em virtude do aumento da permeabilidade vascular, alguns fluidos, eletrólitos e proteínas escapam, em quantidades elevadas, através da parede endotelial dos vasos e são coletadas no espaço intercelular, consequentemente, induzindo a uma resposta inflamatória e edema. Um método simples para a mensuração do percentual de edema, ou seja, uma avaliação da resposta inflamatória de fase aguda, é baseado na ligação entre proteínas plasmáticas e alguns corantes vitais dentro da região em que esta ocorrendo a inflamação, denominado de análise da permeabilidade vascular. Alguns corantes vitais, como o Azul de Evans, quando administrado por via endovenosa, interage com o nitrogênio básico da albumina plasmática e serve de marcador para detecção de extravasamento de proteínas para os sítios inflamados.

De acordo com Sousa, Bramante e Taga (2005), além de ser uma técnica de simples execução e de desempenho direto, ela permite uma rápida visualização para a avaliação do potencial inflamatório de uma variedade de substâncias que tenham um potencial irritante.

Neste estudo, foram adotados dois métodos para a mensuração da fase aguda da resposta inflamatória: a análise da área de extravasamento do corante, em mm², e a quantificação do corante extravasado, em µg/mL, por meio de espectrofotometria. Ambas as técnicas foram correlacionadas para analisar as

diferenças observadas entre as figuras A e B da Prancha 10, como ilustrado na figura A da Prancha 11. O resultado mostrou uma associação positiva significativa entre as técnicas

Foram observados resultados similares quando os grupos foram comparados (GI e GII $\neq$ GIII e GIV), porém, em relação aos tempos de observação, o primeiro método não demonstrou diferenças estatísticas significativas, diferente do observado na técnica que utilizou a espectrofotometria. Este método mostrou diferenças entre os tempos de 3 e 9 horas, mostrando um aumento gradual na concentração de corante extravasado ($\mu\text{g/mL}$). Isso pode ser explicado devido ao fato do organismo dos animais necessitar de mais tempo para eliminar ou diluir totalmente os princípios ativos das substâncias testadas aumentando, portanto, a quantidade de exsudato inflamatório e edema na região, consequentemente, aumentando a concentração do Azul de Evans.

Tem-se que levar em consideração que a diferença entre os resultados obtidos para as técnicas, considerados os tempos de observação, podem ser explicados também devido às propriedades físico-químicas das substâncias estudadas. Afinal se uma substância tem um poder de difusão maior entre o tecido subcutâneo do animal quando comparada à outra, nem por isso terá uma maior capacidade de agressão a esse tecido. Existe, contudo, uma possibilidade que, apesar dos halos possuírem o mesmo tamanho, a concentração de corante extravasado não ser a mesma, como se pode comprovar com a sua quantificação ($\mu\text{g/mL}$). Pode-se dizer que o método para quantificação do corante pela técnica de espectrofotometria é mais sensível quando se pretende mensurar a concentração do Azul de Evans extravasado.

A ausência de estudos correlatos na área, ou seja, que utilizaram substâncias anestésicas tópicas, torna impraticável a confrontação de dados para a realização da discussão, porém, algumas observações merecem ser comentadas em relação ao material e métodos de outros estudos que utilizaram as mesmas técnicas. Por exemplo, a maioria deles (SOUZA, BRAMANTE e TAGA, 2005; SILVA, ALMEIDA e SOUZA, 2004; SOARES e SOUZA, 2003; TRULILLO JR et al, 2003; CANOVA et al, 2002; SILVEIRA, TAVARES e SOARES, 1994) usa um dispositivo padronizado de diferentes diâmetros para a realização das biópsias, variando entre 23 e 35 mm. Neste estudo, não foi utilizado esse método pelo fato de não existir garantias de que os halos azulados formados pelo extravasamento do corante Azul de Evans fossem menores que os diâmetros utilizados por esses pesquisadores. Há experimentos que descrevem apenas um período de observação, como pode ser visto em Nagem-Filho et al (2003) e Silveira, Tavares e Soares (1994) enquanto outros usam, na maioria das vezes, dois ou três períodos de observação. Neste trabalho foram utilizados três períodos para observação da fase aguda da inflamação (3, 6 e 9 horas) os quais caracterizam as respostas de fase aguda. Outra importante diferença está no fato de que os resultados apresentados por Souza, Bramante e Taga (2005); Silva, Almeida e Souza (2004); Brunini (2003) e Souza e Soares (2003) em relação ao Grupo Controle (solução salina) mostram valores muito maiores que os agora observados, que se mantiveram muito próximos de zero, comparáveis inclusive com aquele encontrados por Nagem – Filho et al (2004) e Silveira, Tavares e Soares (1994).

Essas diferenças podem ser explicadas devido a forma como foi realizada a obtenção do branco da amostra, pois, os trabalhos citados anteriormente utilizaram a própria solução de formamida para tal etapa. No presente trabalho e

naquele descrito em Canova et al (2002) foi usado, como branco da amostra, para realização das mensurações de espectrofotometria, uma solução preparada do fluido extraído de amostras das biópsias removidas da região dorsal dos animais que, apesar de terem sido inoculados com o Azul de Evans, não apresentavam evidências visuais dos halos azulados de extravasamento do corante. Preferiu-se a utilização desse protocolo porque a formamida não é específica somente para a extração do corante Azul de Evans presente nas áreas de inflamação, pois ela dissolve lipídios, ocasionando turbidez da amostra levando a erros, visto que a mesma apresenta absorção de luz. Outro fator importante é que, naqueles estudos, foram utilizadas fórmulas matemáticas pré-determinadas para o cálculo dos valores das concentrações de Azul de Evans e não a interpolação dos dados obtidos, na espectrofotometria, em uma equação de reta confeccionada com valores conhecidos de concentração do corante, como realizado neste estudo. Isso pode ter causado as diferenças nos resultados obtidos por eles.

As reações teciduais na região subcutânea podem variar com o material implantado, de acordo com o seu tamanho, sua consistência e pureza, bem como pela condição de implantação desse material (TORNECK, 1966). Muitos desses fatores que podem afetar as reações teciduais na região subcutânea, contudo, podem ser controlados usando as recomendações apresentadas para a *American Dental Association (ADA)* por meio do *Concil on Dental Materials and Devices* (1972), divulgado com o objetivo de padronizar a metodologia para a avaliação da reação inflamatória em testes de curta duração. Seguindo essas recomendações, este trabalho utilizou tubos de polietileno para avaliar a reação inflamatória no tecido subcutâneo de ratos quando esses foram implantados na região dorsal, contendo no seu interior as substâncias testadas durante os estudos.

Além de proporcionar um maior contato dessas substâncias com a região do tecido conjuntivo, os tubos de polietileno facilitam a localização do material implantado.

De acordo com a análise das lâminas, realizada de forma qualitativa e semi-quantitativa, ou seja, sendo feita a descrição dos achados histopatológicos (qualitativa) e a atribuição de escores aos níveis de inflamação (semi-quantitativa), observou-se para o período de 2 dias, no GI, intensa reação inflamatória sendo que, 40% dos escores estavam caracterizados como reação severa e 40% como reação leve, totalizando 80% desses valores. De acordo com os resultados apresentados em Oliveira et al (2004) o processo de degradação acomete o recrutamento de células predominantemente polimorfonucleares (PMNs) no estágio inicial da fase aguda da inflamação. Esse estágio é também relacionado com o trauma cirúrgico. De fato, a presença de um preponderante exsudato inflamatório agudo no grupo de dois dias de observação para a análise histológica pode não ter sido causado somente pela presença das substâncias testadas, mas também, pelo próprio trauma cirúrgico, especialmente no grupo controle, que apresentou 20% da contagem dos escores caracterizados como inflamação de nível moderado. Apesar dos resultados apresentados na análise qualitativa, não foram observadas diferenças significativas entre os tipos de tratamento para o período de 2 dias.

Quando o segundo período do estudo (5 dias) foi analisado não encontramos diferenças significativas entre os grupos, o que demonstra uma regressão da intensidade do infiltrado inflamatório após decorridos mais alguns dias da primeira avaliação.

Entretanto, quando o terceiro período de estudo (15 dias) foi analisado, algumas diferenças foram observadas, tanto para a análise qualitativa das lâminas quanto para a semi-quantitativa. Em relação a análise semi-quantitativa, pode-se observar, de acordo com a figura C da Prancha 15, uma grande diminuição no percentual dos escores para os grupo I, II e IV, sendo que para o GI, 100% dos valores foram caracterizados como tendo um nível de inflamação considerado leve, demonstrando uma regressão da intensidade do infiltrado inflamatório, como antes observado para o período de 5 dias. Contudo, quando o percentual de escores do GII foi observado, pôde-se ver que houve um aumento considerável na evolução do quadro inflamatório ao compará-los com os resultados obtidos para o mesmo tratamento no período de 2 e 5 dias, apresentando 80% dos seus valores caracterizados como inflamação de nível moderado. Quando são comparados os resultados da análise semi-quantitativa, esse é o único período de observação que possui diferenças entre os tipos de tratamento, tendo GII como o grupo que apresentou o maior nível de inflamação, diferente, portanto, de todos os outros tratamentos. Não foram observadas, contudo, diferenças entre os grupos I e III, porém ambos foram diferentes do grupo controle. A explicação para o fato do grupo II apresentar um potencial mais irritante a longo prazo reside na composição química de sua fórmula, influenciada não só por seus princípios ativos (lidocaína e prilocaína, que fazem parte do gel Teste) mas também pelas substâncias formadoras do veículo para essas formulações, principalmente aqueles componentes oleosos (óleo de rícino polioxitileno hidrogenado e do carboxipolimetileno) que podem dificultar a eliminação ou a diluição dessas substâncias a longo prazo. Isso acarreta, portanto um incremento considerável na quantidade de células inflamatórias, bem como do exsudato inflamatório e um

aumento da quantidade de vasos sanguíneos na região, consequentemente, elevando os níveis inflamatórios.

De acordo com os resultados apresentados e tendo em vista que o tempo de atuação do Gel Teste é de curta duração, já que se destina a aplicação dentro de bolsas periodontais para a realização de procedimentos de raspagem e alisamento radicular, concluímos que houve uma boa biocompatibilidade, pois quando foi comparado com o Grupo Controle não foram observadas grandes diferenças entre eles.

Deve ser mencionado que nenhum sinal de necrose tecidual ou presença de células do sistema imune foram observados em qualquer período do estudo.

Apesar de alguns trabalhos, como os de Ribeiro, Sanches e Okamoto (2003) e Pullin e Carvalho (1984) utilizarem soluções anestésicas em seus procedimentos, não podemos confrontar seus resultados com os desta pesquisa por se tratarem de substâncias de forma química diferente da aqui utilizada. Porém, alguns comentários tornam-se necessários em relação à técnica de execução dos métodos, principalmente em relação ao processo laboratorial histológico. Ribeiro, Sanches e Okamoto (2003) também realizaram os cortes histológicos para a análise das lâminas, no sentido longitudinal em relação aos tubos de polietileno, porém, estes se estenderam além dos tubos, o que pode ter gerado um viés de aferição dos resultados, pois a simples presença do polietileno pode gerar uma reação inflamatória de corpo estranho. Neste trabalho os cortes foram feitos até que se observasse a presença de fragmentos dos tubos incluídos em blocos de parafina,

sendo estes últimos cortes então excluídos, evitando a dificuldade comentada acima e melhorando a avaliação do tecido presente junto à abertura tubular, área principal de análise.

7 CONCLUSÃO

1. As fórmulas farmacêuticas manipuladas apresentaram controle de qualidade adequado, apresentando boas características físico-químicas e microbiológicas.
2. Os testes de absorção percutânea in vitro e in vivo mostraram resultados compatíveis com o uso em cavidade bucal, apresentando uma absorção satisfatória.
3. O Gel Teste e o EMLA[®] mostraram ser biocompatíveis, considerando os períodos iniciais do estudo para análise da biocompatibilidade.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, T. A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Coloids Surf.**, v. 96, p. 1-46, 1995.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. Council on dental materials and devices – recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **J.A.D.A.** v. 84, n. 2, p. 382-387, 1972.

ANDRADE, F. R. O. et al. Análise microbiológica de matérias primas e formulações farmacêuticas magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia.**, v. 2, n. 2, p. 38-44, 2005.

APPEL, G.; REUS, M. **Formulações aplicadas à Odontologia.** São Paulo: RCN Editora, 2003.

ARAUJO, L. M. T.; AMARAL, J. L. G. Alergia à lidocaína: relato de caso. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 54, n. 5, p. 672-676, 2004.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas.** 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº. 33, de 19 de abril de 2000. Regulamenta as boas práticas de manipulação de medicamentos em farmácias, além de trazer como anexo, o roteiro de inspeção para farmácias. Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 481 de 23 de setembro de 1999. Controle de qualidade microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasil, zona urbana, 1986. Brasília, 1988.

BRESOLIN, T. M. B.; CEDINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Florianópolis: Univali, 2003.

BRONAUGH, R. L. Methods for in vitro percutaneous absorption. In: Marzulli, F. N.; Maibach, H. I. **Dermatotoxicology**. 5 ed. Washington: Taylor & Francis, 1996. Cap. 25, p. 317 – 324.

BRUNINI, S. H. S. **Avaliação da intensidade da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos frente ao implante dos cimentos endodônticos endométhasone, Sealer 26 e AH Plus: teste edemogênico e análise microscópica**. 2003, 82 f. Tese (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.

CANOVA, G. C. et al. Estudo do poder flogógeno de quatro cimentos obturadores de canais radiculares por meio do teste edemogênico. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v.10, n. 3, p.128-133, 2002.

CARR, M. P.; HORTON, J. E. Clinical evaluation and comparison of 2 topical anesthetics for pain caused by needle sticks and scaling and root planing. **J Periodontol.**, v. 72, n. 4, p. 479-84, 2001.

CARVALHO, A. C. P.; et al. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo a alguns anestésicos locais. Estudo histológico em ratos. **Rev. Fac. Odontol. Araçatuba.**, v. 5, n. 12, p. 53-61, 1976.

COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Farmacopéia Brasileira**, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

COSTA, C. A. S.; HEBLING, J.; SOUZA, P. P. C. Testes de biocompatibilidade. In: ESTRELA, C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. Cap. 10, p. 161-194.

DENTSPLY INT. Disponível em:
<<http://www.oraqix.com/default.aspx?pageid=10>>. Acesso em: 31set. 2005.

DEVERS, A.; GALER, B. S. Topical lidocaine patch relieves a variety of neuropathic pain conditions: an open-label study. **Clin. J. Pain.**, v. 16, n. 3, p. 205-8, 2000.

DONALDSON, D.; MEECHAN, J. G. A comparison of the effects of EMLA cream and topical 5% lidocaine on discomfort during gingival probing. **Anesth. Prog.**, v. 42, n. 1, p. 7-10, 1995.

DONALDSON, D. et al. A placebo-controlled multi-centred evaluation of an anaesthetic gel (Oraqix) for periodontal therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, n. 3, p. 171-5, 2003.

EMLA: creme dermatológico. Farm. Resp., Daniela M. Castanho, Cotia, SP. AstraZeneca do Brasil, 2004. Bula de remédio.

FERREIRA, A.O. **Guia prático da farmácia magistral**. 2. ed. Juiz de Fora, 2002.

IESE, E. F.; HAGEN, T. A. Pré-Formulação. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Guelbenkian, 2001.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: EDUSP, 2004.

FRISKOPP, J.; HULEDAL, G. Plasma levels of lidocaine and prilocaine after application of Oraqix, a new intrapocket anesthetic, in patients with advanced periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 5, p. 425-9, 2001.

FRISKOPP, J.; NILSSON, M.; ISACSSON, G. The anesthetic onset and duration of a new lidocaine/prilocaine gel intra-pocket anesthetic (Oraqix) for periodontal scaling/root planing. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 5, p. 453-8, 2001.

GEHLEN, M. L. et al. Avaliação espectrofotométrica do azul de Evans na reação inflamatória da córnea: estudo experimental em coelhos. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 67, n. 2, p. 219-225, 2004.

GODDARD, E. D.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P. Interaction of surfactants with polymers and proteins. Boca Raton: **CRC Press**, 1993.

GOODELL, G. G.; GALLAGHER, F. J.; NICOLL, B. K. Comparison of a controlled injection pressure system with a conventional technique. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 90, n. 1, p. 88-94, 2000.

GUEDES, L. C. **Controle de qualidade na indústria farmacêutica**. Manuais CNI . Rio de Janeiro. 1987.

GILBERT et al. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery. **J. Control. Release**. V. 5, p. 113-18, 1987.

GUY, R. H.; POTTS, R. O. Structure-permeability relationships in percutaneous absorption. **J. Pharm. Sci.** v. 81, p. 603-604, 1992.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 5.ed., Rio de Janeiro: Interamericana; 1976.

HERDEVALL, B.M. et al. Plasma levels of lidocaine, o-toluidine, and prilocaine after application of 8.5 g Oraqix in patients with generalized periodontitis: effect on blood methemoglobin and tolerability. **Acta Odontol. Scand.**, v. 61, n. 4, p. 230-4, 2003.

HOWES, D. et al. Methods for assessing percutaneous absorption. The report and recommendations of ECVAM workshop 13. **ATLA**. n. 24, p. 81-106, 1996.

JEFFCOAT, M.K. et al. Intrapocket anesthesia for scaling and root planing: results of a double-blind multicenter trial using lidocaine prilocaine dental gel. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 7, p. 895-900, 2001.

JUHLIN, L.; HAGGLUND, G.; EVERS, H. Absorption of lidocaine and prilocaine after application of a eutectic mixture of local anesthetics (EMLA) on normal and diseased skin. **Acta Derm. Venereol.**, v. 69, n. 1, p. 18-22, 1989.

JUNGINGER, H. E.; HOOGSTRAATE, J. A.; VERHOEF, J. C. Recent advances in buccal drug delivery and absorption--in vitro and in vivo studies. **J Control Release**., v. 1, n. 62(1/2), p. 149-59, 1999.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia oral**: texto, atlas e correlações clínicas. São Paulo: Panamericana; 1999.

KUMAR, M. N. V. R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **J. Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v. 3, n.2, p. 234-258, 2000.

LÖFFLER, H.; DREHER, F.; MAIBACH, H.I. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. **Br. J. Dermatol.**, v. 15, n. 1/4, p. 746-52, 2004.

MAGNUSSON, I. et al. Intrapocket Anesthesia for Scaling and Root Planing in Pain-Sensitive Patients. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 5, p. 597-602, 2003.

MALAMED, S. F. **Manual de anestesia local**. Rio de Janeiro: Elsevier Ed, 2005.

MALMSTEN, M.; LINDMAN, B. Self-assembly in aqueous block copolymer solution. **Macromolecules**, v. 25, p. 5440-45, 1992.

MCMILLAN, A.S.; WALSHAW, D.; MEECHAN, J.G. The efficacy of Emla and 5% lignocaine gel for anaesthesia of human gingival mucosa. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 38, n. 1, p. 58-61, 2000.

MEECHAN, J.G.; THOMASON, J.M. A comparison of 2 topical anesthetics on the discomfort of intraligamentary injections: a double-blind, split-mouth volunteer clinical trial. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 87, n. 3, p. 362-5, 1999.

MEZADRI, T. J.; TOMÁZ, V. A.; AMARAL, V. L. **Animais de laboratório: cuidados na experimentação animal**. Florianópolis: UFSC, 2004.

MIYAZAKI, S. et al. Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical administration of anticancer agents. **Chem Pharm Bull.**, v. 32, n. 10, p. 4205-8, 1984.

MUNSHI, A. K.; HEGDE, A. M.; LATHA, R. Use of EMLA: is it an injection free alternative?. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 25, n. 3, p. 215-92, 2001.

NAGEM-FILHO, H.; MONTEIRO, C. R.; NAGEM, H. D. et al. Effect of dental adhesives on the exudative phase of the inflammatory process in subcutaneous tissue of rats. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 17, n. 2, p.109-112, 2003.

OECD. **Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies**. Paris 2004, p. 31. (Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, n. 28).

OECD. **Guideline for the Testing of Chemicals, Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method**, Paris, 1995, v.107.

OLIVEIRA, R.C. et al Tissue response to a membrane of demineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. **Braz Dent J.**, v. 15, n. (1/3), p. 3-8, 2004.

PANZERI, H. et al. Avaliação de dentifrícios. 1ª parte- consistência, densidade, pH, "vida útil" e perda de água. **Odont. Mod.**, v.5, n.3, p.4-10, 1978.

PELCZAR JR., M.J.; CHAN, E.C.S. & KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações, volume II**. 2^a. edição. São Paulo: Makron Books, 1996.

PERRY, D. A.; GANSKY, S. A.; LOOMER, P. M. Effectiveness of a transmucosal lidocaine delivery system for local anaesthesia during scaling and root planing. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 6, p. 590-4, 2005.

PULLIN, A. M.; CARVALHO, A. C. P. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo a soluções de álcool e/ou anestésicos locais. Estudo histológico em ratos. **RGO.**, v. 32, n. 4, p. 187-295, 1984.

PIHLSTROM, B. L. et al. Pain after periodontal scaling and root planing. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 130, n. 6, p. 801-7, 1999.

PIPA VALLEJO, A.; GARCIA-POLA VALLEJO, M. J. Anestésicos locais en odontoestomatología. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, v. 9, n. 5, p. 438-443, 2004.

REDDY, M. B. et al. Determining dermal absorption parameters in vivo from tape strip data. **Pharm. Res.**, v. 19, n. 3, p. 292-8, 2002.

REGATIERI, F. L. F. Intoxicação por anestésicos locais. Disponível em: <<http://www.anesthesiologia.com.br/artigos.php?itm=57>>. Acesso em: 22 ago. 2005.

RIBEIRO, P. D. Jr; SANCHES, M. G.; OKAMOTO, T. Comparative analysis of tissue reactions to anesthetic solutions: histological analysis in subcutaneous tissue of rats. **Anesth. Prog.**, v. 50, n. 4, p.169-80, 2003.

ROBERTS, D. H.; SOWRAY, J. H. **Analgesia local em Odontologia**. São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda, 1995.

ROUGIER, A.; LOTTE, C. The Stripping Technique. In: SHAN, V. P.; MAIBACH, H. I. **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration**. New York: Plenum Press, 1993, 163-181 p.

SALOUM, F.S. et al. A clinical comparison of pain perception to the Wand and a traditional syringe. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 89, n. 6, p. 691-5, 2000.

SCHAEFER, H.; REDELMEIER, T. E. Prediction and Measurement of Percutaneous absorption. In: _____. **Skin Barrier: Principles of percutaneous absorption**. New York: Editora Karger. 1996

SCHERLUND, M., MALMSTEN, M., BRODIN, A. Stabilization of a thermosetting emulsion system using ionic and non-ionic surfactants. **Int. J. Pharm.**, v. 173, p. 103-116, 1998.

SCHERLUND, M. et al. Thermosetting microemulsions and mixed micellar solutions as drug delivery systems for periodontal anesthesia. **Int J Pharm.**, v. 20, n. 1, p. 103-16, 2000.

SHIN, S. C.; CHO, C. W.; YANG, K. H. Development of lidocaine gels for enhanced local anesthetic action. **Int. J. Pharm.** v. 9, n. 287(1-2), p. 73-8, 2004.

SILVA, F. B.; ALMEIDA, J. M.; SOUSA, S. M. G. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. **Braz. oral res.**, v. 18, n. 2, 2004.

SILVEIRA, NL; TAVARES, T; SOARES, IJ. Potencial irritativo de soluções a base de EDTA. **Rev. Assoc. Paul. Cirurg. Dent.** 1994; 48: 1489-93

SOARES, A. B.; SOUZA, S, M, G. Avaliação da biocompatibilidade do EDTA, EGTA e ácido cítrico em tecido subcutâneo de ratos. **Rev. Odonto Ciênc.** v.18, n. 39, p. 17-22, jan- mar. 2003.

SOUSA, S. M. G. de; BRAMANTE, C. M.; TAGA, E. M.. Biocompatibility of EDTA, EGTA and citric acid. **Braz. Dent. J.**, v.16, n.1, p. 3-8, 2005.

SUSIN, C. et al. Periodontal Attachment Loss in an Urban Population of Brazilian Adults: Effect of Demographic, Behavioral, and Environmental Risk Indicators. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 7, p.1033-1041, 2004.

TORNECK, C. D. Reaction of rat connective tissue of polyethylene tube implants. Part I. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 21, n. 3, p. 379-87, 1966.

TRUJILLO JR, R et al. Avaliação da biocompatibilidade do ácido cítrico em diferentes concentrações – teste edemogênico. **Salusvita**. V. 22,n. 2, p. 17-180, 2003.

UKADA, K.; TAKEUCHI, Y.; MOVAT, H.Z. Simple method for quantification of enhanced vascular permeability. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.** v. ?; n. 133. p. 1384-87, 1970.

VALERA, M. C. et al. Biological compatibility of some types of endodontic calcium hydroxide and glass ionomer cements. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 12, n. 4, p. 294-300, 2004.

van STEENBERGHE, D. et al. Patient Evaluation of a Novel Non-Injectable Anesthetic Gel: A Multicenter Crossover Study Comparing the Gel to Infiltration Anesthesia During Scaling and Root Planing. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 11, p. 1471-1478, 2004b.

VASCONCELOS, R.J.H. et al. Alterações sistêmicas decorrentes do uso da lidocaína e prilocaína na prática odontológica. **Rev. Cir. Traumat. Buço-Maxilo-Facial.** v.1, n.2, p. 13-19, 2002.

VICKERS, E.R. et al. Pharmacokinetics of EMLA cream 5% application to oral mucosa. **Anesth Prog.**, v. 44, n. 1, p. 32-7, 1997.

WESTER, R. C; MAIBACH, H. I. Structure-Activity Correlations in Percutaneous Absorption. In: Bronaugh, R. L.; Maibach, H. I. **Percutaneous Absorption: Drugs, Cosmetics, Mechanisms.** 3 Ed. Marcel Dekker Inc., New York, 1999, p. 107-123.

APÊNDICE A – Gráfico 1

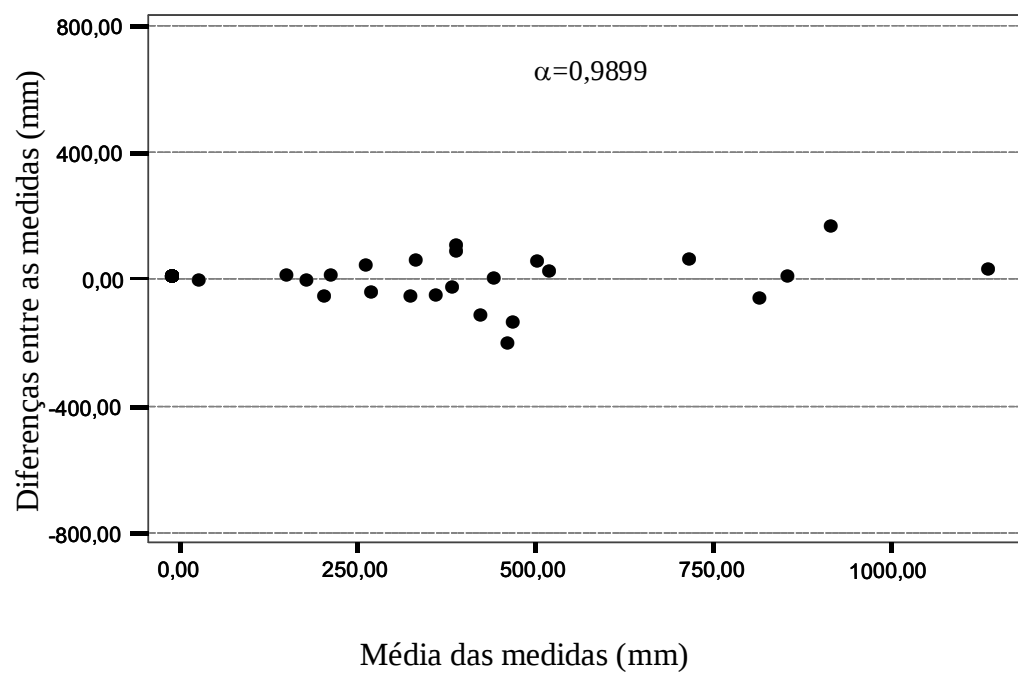


Gráfico 1 - Reprodutibilidade intra-examinador – Coeficiente de correlação intra-classe para a mensuração da área de extravasamento do corante Azul de Evans.

APÊNDICE B – Tabelas 14 a 28

Tabela 14 – Análise descritiva para os valores de “Tape Stripping” in vitro.

N° de fitas	Substâncias							
	Lidocaína				Prilocaína			
	GI		GII		GI		GII	
	%	% Acum.	%	% Acum.	%	% Acum.	%	% Acum.
1	5,77	5,77	4,41	4,41	7,16	7,16	4,44	4,44
2	4,92	10,69	4,21	8,62	4,76	11,92	4,26	8,70
3	3,14	13,83	4,63	13,25	2,97	14,89	4,31	13,01
4	5,00	18,83	4,58	17,83	4,97	19,85	4,27	17,28
5	4,88	23,71	4,30	22,13	4,76	24,61	4,16	21,44
6	4,86	28,57	4,44	26,57	4,72	29,33	4,22	25,66
7	4,89	33,46	4,24	30,81	4,72	34,05	3,95	29,61
8	4,71	38,17	4,20	35,01	4,41	38,46	3,88	33,49
9	4,92	43,08	4,50	39,51	4,90	43,36	4,28	37,77
10	5,12	48,21	4,47	43,98	5,06	48,41	4,16	41,93
11	4,83	53,03	4,37	48,35	4,59	53,00	4,07	46,00
12	5,05	58,09	4,24	52,60	4,99	57,99	4,08	50,08
13	4,32	62,41	4,79	57,39	4,00	61,99	4,54	54,62
14	5,14	67,55	4,18	61,57	5,14	67,13	3,86	58,48
15	5,38	72,93	1,58	63,89	5,44	72,57	1,46	61,71

Acum.= Acumulada

Tabela 15 – Análise descritiva para os valores obtidos pelo método de células de difusão in vitro.

Tempo (min)	Substâncias			
	GI		GII	
	%	% Acum.	%	% Acum.
0	4,64	4,64	4,10	4,10
30	4,13	8,77	3,88	7,99
60	3,50	12,27	3,28	11,27
90	2,99	15,26	2,94	14,21
120	2,58	17,85	2,60	16,81
150	1,88	19,72	2,32	19,13
180	1,88	21,60	2,77	21,90

Acum.= Acumulada

Tabela 16 - Análise descritiva para os valores de “Tape Stripping” in vivo.

		Substâncias							
		GI				GII			
N° de fitas	Pacientes	Lidocaína		Prilocaina		Lidocaína		Prilocaina	
		%	% Acum.	%	% Acum.	%	% Acum.	%	% Acum.
1	1	1,14	1,73	0,57	0,57	0,64	0,64	1,11	1,11
2		0,75	2,48	1,36	1,93	1,12	1,76	1,33	2,44
3		1,08	3,56	1,31	3,24	1,19	2,95	1,50	3,94
4		0,85	4,41	0,93	4,17	0,70	3,65	1,64	5,58
5		1,31	5,72	1,01	5,17	1,80	5,45	0,80	6,37
1	2	1,34	1,34	0,50	0,50	0,84	0,84	1,37	1,37
2		2,16	3,50	1,33	1,83	0,64	1,49	1,24	2,61
3		1,34	4,84	0,95	2,79	1,99	3,48	1,41	4,02
4		2,63	7,47	1,52	4,30	2,01	5,49	1,14	5,16
5		2,13	9,60	1,27	5,58	0,49	5,98	1,28	6,44
1	3	2,13	2,13	1,46	1,46	2,51	2,51	1,61	1,61
2		2,35	4,49	1,65	3,11	2,25	4,76	1,45	3,06
3		0,95	5,44	0,78	3,89	1,73	6,49	1,18	4,24
4		1,11	6,55	1,29	5,18	1,73	8,22	1,22	5,46
5		2,66	9,21	1,65	6,84	1,29	9,52	0,93	6,40
1	4	0,34	0,34	0,34	0,34	0,74	0,74	2,21	2,21
2		0,42	0,75	0,90	1,24	1,85	2,59	1,39	3,60
3		0,49	1,24	0,78	2,02	0,92	3,51	0,79	4,40
4		1,20	2,44	1,29	3,31	1,25	4,76	1,07	5,47
5		1,20	3,65	1,19	4,50	1,10	5,87	0,76	6,23
1	5	0,66	0,66	0,65	0,65	1,66	1,66	1,26	1,26
2		0,56	1,22	0,58	1,22	1,13	2,79	0,97	2,23
3		0,83	2,06	0,75	1,98	1,19	3,98	1,05	3,28
4		3,35	5,40	2,29	4,26	2,11	6,09	1,62	4,91
5		1,47	6,87	1,19	5,45	3,53	9,62	2,34	7,25
1	6	1,14	1,14	0,89	0,89	1,41	1,41	1,09	1,09
2		1,33	2,47	1,05	1,94	1,12	2,53	0,84	1,93
3		1,70	4,17	1,31	3,26	1,13	3,66	0,87	2,80
4		0,85	5,02	0,67	3,93	1,56	5,22	1,66	4,46
5		1,10	6,12	0,84	4,77	1,80	7,02	1,33	5,79
1	7	0,67	0,67	1,09	1,09	0,67	0,67	1,42	1,42
2		0,75	1,42	0,84	1,93	0,75	1,42	1,33	2,75
3		0,91	2,32	0,87	2,80	0,91	2,32	0,90	3,65
4		1,04	3,37	1,66	4,46	1,04	3,37	1,64	5,29
5		1,13	4,50	1,33	5,79	1,13	4,50	0,85	6,14
1	8	0,60	0,60	0,58	0,58	0,64	0,64	1,37	1,37
2		1,32	1,93	1,36	1,93	0,85	1,49	0,87	2,24
3		1,08	3,01	1,05	2,98	1,36	2,85	1,50	3,74
4		1,02	4,02	0,95	3,93	0,70	3,55	0,69	4,44
5		1,31	5,34	1,68	5,61	0,80	4,35	0,79	5,23

Acum.= Acumulada

Tabela 17 -Teste de Normalidade dos valores da quantidade de corante extravasado (ug/mL)

Grupos	Tempo (horas)	Shapiro-Wilk		
		Estatística	G.L	Sig. (p)
Teste	3	0,954	5	0,711
Poloxamer	3	0,806	5	0,100
EMLA	3	0,884	5	0,357
Salina	3	0,736	5	0,033
Teste	6	0,975	5	0,871
Poloxamer	6	0,794	5	0,086
EMLA	6	0,951	5	0,682
Salina	6	0,757	5	0,047
Teste	9	0,845	5	0,229
Poloxamer	9	0,587	5	0,010
EMLA	9	0,793	5	0,085
Salina	9	0,746	5	0,040

Tabela 18 - Teste de igualdade das variâncias – Levene

Variável	F	G.L.	Graus de liberdade	Significância (p)
Concentração (ug/mL)	7,327	11	48	0,0001*

*p<0,05 – Significativo – As variâncias não são homogêneas

Tabela 19 – Análise de variância 2 critérios para comparação entre os diferentes fatores.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados médios	Valor de F	Sig.
GRUPO	20,469	3	6,823	17,127	0,000*
TEMPO	3,300	2	1,650	4,142	0,022*
GRUPO * TEMPO	4,461	6	0,743	1,866	0,106
Tratamentos	28,229(a)	11	2,566	6,442	0,000*
Resíduos	19,122	48	0,398		
Total	47,351	59			

* Diferenças significativas

Tabela 20 – Teste de comparações múltiplas (LSD) para a determinação das diferenças entre os grupos.

Grupos	Dif. entre as médias	Valor de P	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Teste “versus” Poloxamer	1,163*	0,0001*	0,550	1,777
Teste “versus” EMLA	0,069	0,991	-0,545	0,682
Teste “versus” Controle	1,238*	0,0001*	0,624	1,851
Poloxamer “versus” EMLA	-1,094*	0,0001*	-1,708	-0,481
Poloxamer “versus” Controle	0,074	0,988	-0,539	0,688
EMLA “versus” Controle	1,169*	0,0001*	0,555	1,782

* Diferenças significantes

Tabela 21 – Teste de comparações múltiplas (LSD) para a determinação das diferenças entre os tempos.

Tempos	Dif. entre as médias	Valor de P	Intervalo de Confiança 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
3 “versus” 6	-0,205	0,563	-0,688	0,028
3 “versus” 9	-0,567*	0,018*	-1,050	-0,085
6 “versus” 9	-0,362	0,176	-0,845	0,121

* Diferenças significantes

Tabela 22 – Análise descritiva da frequência absoluta e relativa dos escores para reação inflamatória no período de observação de 2 dias.

ESCORES	GRUPOS							
	TESTE		EMLA		POLOXAMER		CONTROLE	
	F.a	F.r (%)	F.a	F.r (%)	F.a	F.r (%)	F.a	F.r (%)
0	1	20	1	20	0	0	4	80
1	2	40	3	60	2	40	0	0
2	0	0	1	20	2	40	1	80
3	2	40	0	0	1	20	0	0
TOTAL	5	100	5	100	5	100	5	100

Tabela 23 – Análise descritiva da frequência absoluta e relativa dos escores para reação inflamatória no período de observação de 5 dias.

ESCORES	GRUPOS							
	TESTE		EMLA		POLOXAMER		CONTROLE	
	F.a	F.r (%)	F.a	F.r (%)	F.a	F.r (%)	F.a	F.r (%)
0	0	0	1	20	0	0	3	60
1	5	100	1	20	3	60	1	20
2	0	0	2	40	1	20	1	20
3	0	0	1	20	1	20	0	0
TOTAL	5	100	5	100	5	100	5	100

Tabela 24 – Análise descritiva da frequência absoluta e relativa dos escores para reação inflamatória no período de observação de 15 dias.

ESCORES	GRUPOS							
	TESTE		EMLA		POLOXAMER		CONTROLE	
	F.a	F.r (%)	F.a	F.r (%)	F.a	F.r (%)	F.a	F.r (%)
0	0	0	0	0	0	0	4	80
1	5	100	0	0	4	80	1	20
2	0	0	4	80	1	20	0	0
3	0	0	1	20	0	0	0	0
TOTAL	5	100	5	100	5	100	5	100

Tabela 25 – Teste de Kruskal – Wallis para comparação entre os tratamentos para o período de 2 dias.

	Mediana
Chi - Quadrado	5,760
Grau de liberdade	3
Sig.	0,124

Diferenças não significativas.

Tabela 26 – Teste de Kruskal – Wallis para comparação entre os tratamentos para o período de 5 dias.

	Mediana
Chi - Quadrado	4,478
Grau de liberdade	3
Sig.	0,214

Diferenças não significativas.

Tabela 27 – Teste de Kruskal – Wallis para comparação entre os tratamentos para o período de 15 dias.

	Mediana
Chi - Quadrado	15,940
Grau de liberdade	3
Sig.	0,001*

Diferenças significativas*.

Tabela 28 – Teste de comparações múltiplas (Mann-Whitney) para a determinação das diferenças entre os tratamentos no período de 15 dias.

Grupos	Valor de P
Teste “versus” Poloxamer	0,609
Teste “versus” EMLA	0,001*
Teste “versus” Controle	0,032*
Poloxamer “versus” EMLA	0,001*
Poloxamer “versus” Controle	0,032*
EMLA “versus” Controle	0,001*

Diferenças significativas *

ANEXO A - Aprovação do projeto de pesquisa intitulado Análise da Absorção Percutânea (mucosa) de Gel e Creme anestésico local pelo Método de “Tape Stripping”