

Adriana Marques Toscano

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Adriana Marques Toscano

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais

Tese de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre

Orientação: Prof. Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões, Professor Associado com Agregação da Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra e Vice-presidente, Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.; Doutora Cláudia Liliana de Bastos Sousa Silva, Diretora de Investigação, Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

Coimbra, 2013

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli

Agradecimentos

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese, o meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Sérgio, que me deu a oportunidade de realizar este projeto de mestrado.

A todos os que, na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA, me acolheram e me permitiram o desenvolvimento deste projeto auxiliando nas mais diversas tarefas e me permitiram crescer como pessoa e profissional.

À Cláudia, pelo acompanhamento científico ao longo de todo o projeto, imprescindível ao desenvolvimento desta tese e por toda a revisão crítica da tese. Obrigada por todas as palavras de incentivo e de orientação.

A todos os colegas da Bluepharma pelo companheirismo e todo o apoio prestado e principalmente aos que hoje se tornaram amigos, por me estarem presentes nos momentos mais difíceis, dos quais destaco a Andreia, companheira de projeto, amiga, sem a qual não teria conseguido levar este projeto adiante por todo o apoio prestado, pela companhia nas horas passadas no laboratório e pelas análises por ela realizadas.

À Filipa Dinis do Departamento de Engenharia Química por todo o apoio que me deu para a realização dos testes reológicos.

Por último, aos meus pais, essenciais para a realização deste mestrado, que me deram todo o apoio e força para alcançar os meus objetivos.

Resumo

Os anestésicos tópicos são muito importantes para tratamento da dor local em procedimentos cirúrgicos e cosméticos. No entanto, de forma a produzirem o seu efeito terapêutico estes têm que ser veiculados numa formulação apropriada que permita a sua administração e a sua chegada ao local de ação na dose certa.

Por este motivo, o principal objetivo desta tese é o desenvolvimento e caracterização de uma formulação tópica de dois anestésicos locais com recurso a um método estatístico, o desenho de experiências.

Foram testados diversos fatores (% de gelificante, % de neutralizante e presença das substâncias ativas) e foi determinada a sua influência na viscosidade, pH e condutividade das duas formulações estudadas, bem como na libertação inicial e final de lidocaína e prilocaína a partir dessas formulações.

Através do desenho de experiências foi possível estudar vários fatores em simultâneo e respetivas interações, bem como otimizar as formulações, obtendo modelos estatísticos robustos.

Os estudos realizados permitiram alcançar formulações que preenchessem os requisitos que foram definidos inicialmente no *Target Product Profile*.

Abstract

Topical anesthetics are very important for treating local pain and in cosmetic and surgical procedures. However, in order to produce their therapeutic effect they have to be conveyed in an appropriated formulation to allow its administration and its arrival at the site of action in the right dose.

For this reason, the main objective of this thesis is the development and characterization of a topical formulation of two local anesthetics using a statistical method, the design of experiments.

Several factors were evaluated (% of gelling agent, % of neutralizing agent and the presence of the drugs) and their influence on viscosity, pH and conductivity of the two formulations studied, as well as initial and final release of lidocaine and prilocaine from these formulations was determined.

The design of experiments allowed the study of several factors and respective interactions simultaneously, the optimization of the formulation and the definition of robust statistical modes.

In the end of this work it was possible to achieve formulations that met the requirements initially defined in the Target Product Profile.

Índice

Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	viii
Abreviaturas	ix
Introdução	I
1. Pele como via de administração de fármacos	I
2. A Dor e os Anestésicos.....	6
3. Formulações tópicas para administração de fármacos	8
3.1. Microemulsões.....	10
3.2. Formulações comerciais de anestésicos tópicos	13
3.3. Estudos de caracterização das formulações tópicas	16
4. Desenho de Experiências, <i>Quality by Design</i> e <i>Target Product Profile</i>	22
Objetivos	27
Materiais e Métodos.....	28
1. Introdução.....	28
2. Materiais	28
3. Métodos	29
3.1. Preparação das formulações.....	29
3.2. pH.....	31
3.3. Viscosidade	31
3.4. Condutividade.....	31
3.5. DOE.....	32
3.6. Estudos de libertação	34
3.7. Microscopia	36
Resultados e Discussão	37
1. Estudos de pré-formulação	37
2. Desenvolvimento da formulação	47
1º Estudo – Avaliação da influência dos fatores nas características das formulações.....	47
2º Estudo – Otimização das formulações	54
3º Estudo – Estudos de libertação.....	64
3. Resultados de microscopia.....	69
Conclusão.....	71

Perspetivas futuras.....	73
Referências Bibliográficas.....	74
Anexos	83

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema da estrutura da pele humana (cima – representação esquemática; baixo – corte histológico). (adaptado de Halldin, 2011; Welin-berger, 2001).	2
Figura 2: Camadas da epiderme (adaptado de Kermany, 2010).	3
Figura 3: Estrutura de uma ceramida (adaptado de Garrett & Grisham, 2004).	4
Figura 4: Representação das vias de permeação de fármacos através da camada córnea (via transepidérmica) (adaptado de Martins & Veiga, 2002).	5
Figura 5: Estrutura química da lidocaína (Nogueira, Montanari & Donnici, 2009).	7
Figura 6: Esquema representativo da estrutura dos diferentes sistemas de microemulsões. A: Microemulsão o/w; B: Microemulsão w/o; C: Microemulsão bicontínua (adaptado de Lawrence & Rees, 2000).	11
Figura 7: Estrutura Química da Lidocaína (Quality of Medicines, 2010).	13
Figura 8: Estrutura Química da Prilocaina (Quality of Medicines, 2010).	14
Figura 9: EMLA creme em bisnaga de 30g (Drugs Information Online, n.d.).	15
Figura 10: Aplicação de EMLA na mão utilizando um penso oclusivo (Kundu & Achar, 2002).	16
Figura 11: Reómetro equipado com o sistema prato-prato (Sabadini, n.d.).	18
Figura 12: Esquema das células de Franz (Silva et al., 2010).	20
Figura 13: Métodos de preparação das formulações. A: Preparação da formulação por agitação magnética; B: Preparação da mistura com auxílio de agitação mecânica, com o equipamento misturador.	29
Figura 14: Fluxograma do processo de produção das formulações.	30
Figura 15: Equipamento de medição de condutividade WTW (UNESP, n.d.).	31
Figura 16: Funcionamento do programa de DoE, JMP – inserção dos fatores e dos seus limites e respostas que vão ser avaliadas e respetivos objetivos.	32
Figura 17: Funcionamento do programa de DoE – escolha do tipo de desenho fatorial.	33
Figura 18: Funcionamento do programa de DoE – Tabela com as experiências a realizar.	33
Figura 19: Equipamento PermeGear para 6 células de difusão vertical do tipo Franz. A: suporte das células com sistema de agitação; B: Célula de Franz (PermeGear, 2005).	34
Figura 20: Formulação A (placebo) preparada com o método de agitação magnética e com diferentes proporções dos seus constituintes (Tabela 3).	37
Figura 21: Formulação A preparada com dois métodos diferentes. A: Agitação magnética; B: Agitação mecânica.	38
Figura 22: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ).	39
Figura 23: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ).	40
Figura 24: Preparação da formulação B antes (A) e depois (B) da adição de goma xantana.	44
Figura 25: Gráfico de contorno da formulação A.	56

Figura 26: Zona de trabalho para a formulação A.	57
Figura 27: Gráfico de perfil para a formulação A com características ideais.	57
Figura 28: Gráfico de contorno para a formulação B.	58
Figura 29: Zona de trabalho para a formulação B.	59
Figura 30: Gráfico de perfil para a formulação B ideal.	59
Figura 31: Gráfico de contorno para o DoE da formulação A com inclusão da formulação ideal.	61
Figura 32: Gráfico da superfície de resposta para a formulação ideal que se verifica estar inserida dentro da zona de trabalho. Os valores de viscosidade encontram-se delimitados a verde e de pH a azul.	62
Figura 33: Gráfico de contorno para o DoE da formulação B com inclusão da formulação ideal.	62
Figura 34: Gráfico da superfície de resposta para a formulação ideal que se verifica estar inserida dentro da zona de trabalho. Os valores de viscosidade encontram-se delimitados a azul e os de pH a roxo.	63
Figura 35: Formulação A e B ideais – curva média da % de libertação de lidocaína e prilocaína em função do tempo.	68
Figura 36: Imagem de microscopia ótica de lidocaína HCl (luz polarizada; ampliação de 100x).	69
Figura 37: Imagem de microscopia ótica da prilocaína HCl (luz polarizada; ampliação: A - 100x / B – 400x).	69
Figura 38: Formulação A com lidocaína HCl, observação ao microscópio.	69
Figura 39: Formulação A com prilocaína HCl, observação ao microscópio.	70

Lista de Tabelas

Tabela 1: Perfil alvo do produto (TPP) da microemulsão estudada.....	27
Tabela 2: Constituição das formulações base.....	28
Tabela 3: Composição das formulações inicialmente preparadas.	30
Tabela 4: Variação da viscosidade com a temperatura de análise para as variantes da formulação A.	38
Tabela 5: Valores de viscosidade para a formulação A3 com 2% de carbómero analisada a diferentes temperaturas de armazenamento e durante 3 meses.....	41
Tabela 6: Resultados de pH para a formulação A3 com 2% de carbómero.	41
Tabela 7: Variação do pH da formulação B com armazenamento a 25°C durante 3 meses.	44
Tabela 8: Resultados das experiências do DoE para a formulação A.....	48
Tabela 9: Resultados das experiências do DoE para a formulação B.	49
Tabela 10: Influência de cada um dos fatores na resposta condutividade.	50
Tabela 11: Influência de cada um dos fatores na resposta pH.	50
Tabela 12: Influência de cada um dos fatores na resposta viscosidade.	50
Tabela 13: Parâmetros estatísticos obtidos para a formulação A nos estudos iniciais.	51
Tabela 14: Influência de cada um dos fatores na resposta condutividade.	52
Tabela 15: Influência de cada um dos fatores na resposta pH.	52
Tabela 16: Influência de cada um dos fatores na resposta viscosidade.	52
Tabela 17: Parâmetros estatísticos obtidos para a formulação B nos estudos iniciais.	53
Tabela 18: Resultado das experiências do aumento do DoE para a Formulação A.	54
Tabela 19: Resultado das experiências do aumento do DoE para a Formulação B.....	54
Tabela 20: Parâmetros estatísticos obtidos para o aumento do DoE da formulação A.....	55
Tabela 21: Parâmetros estatísticos obtidos para o aumento do DoE da formulação B.	55
Tabela 22: Resultado da formulação ideal e resultados previstos para a Formulação A.....	60
Tabela 23: Resultado da formulação ideal e resultados previstos para a Formulação B.	60
Tabela 24: Parâmetros estatísticos obtidos para o DoE com inclusão das formulações ideais.	60
Tabela 25: Solubilidade dos fármacos em tampão fosfato pH 7,2.	64
Tabela 26: Resultados das experiências do DoE para a Formulação A com lidocaína HCl e prilocaína HCl.	65
Tabela 27: Resultado das experiências do DoE para a Formulação B com lidocaína HCl e prilocaína HCl.	65
Tabela 28: Fatores que interferem na liberação de fármacos na formulação A (a - lidocaína HCl aos 30'; b - lidocaína HCl aos 120'; c – prilocaína HCl aos 30'; d – prilocaína HCl aos 120').....	66
Tabela 29: Fatores que interferem na liberação dos fármacos da formulação B (a - lidocaína HCl aos 30'; b - lidocaína HCl aos 120'; c – prilocaína HCl aos 30'; d – prilocaína HCl aos 120').....	67

Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ANOVA – Análise de Variância, do inglês '*Analysis of Variance*'

API – substância ativa, do inglês '*Active Pharmaceutical Ingredient*'

CTD – Documento Técnico Comum, do inglês '*Common Technical Document*'

DoE – desenho de experiências, do inglês '*Design of Experiments*'

EMLA – Mistura Eutética de Anestésicos Locais, do inglês '*Eutectic Mixture of Local Anesthetics*'

FDA – do inglês '*Food and Drug Administration*'

HPLC – Cromatografia líquida de alta precisão, do inglês '*High Performance Liquid Chromatography*'

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor, do inglês '*International Association for the Study of Pain*'

ICH – Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano, do inglês '*International Conference Harmonization*'

o/w – óleo em água, do inglês '*oil in water*'

QbD – do inglês '*Quality by Design*'

TEA – trietanolamina

TPP – Perfil alvo do produto, do inglês '*Target Product Profile*'

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos da América, do inglês '*United States Pharmacopeia*'

w/o – água em óleo, do inglês '*water in oil*'

Introdução

I. Pele como via de administração de fármacos

A pele é o maior órgão do corpo humano, tem uma área de cerca de 1.5 a 2 m² e representa 4 a 5 kg do peso corporal de um adulto normal (Halldin, 2011) e possui uma estrutura bastante complexa (Schmid-Wendtner & Korting, 2006; Welin-berger, 2001). Tem como função essencial manter a barreira entre o interior do corpo humano e o meio ambiente, protegendo também os órgãos internos contra possíveis danos (Benson & Watkinson, 2012; Dew, 2011; Kermany, 2010) e funciona também como um meio de comunicação com o exterior, pois permite ao cérebro obter as sensações de calor, toque, pressão e dor (Halldin, 2011; Welin-berger, 2001).

As principais funções da pele são: proteger o corpo contra a perda de água (desidratação), regular a temperatura corporal e operar como uma barreira que impede a entrada de vírus e bactérias para o corpo humano e conferir proteção contra a radiação ultravioleta (Dew, 2011; Halldin, 2011). A pele também tem como função a sudorese e toda a função sensorial (ex: toque, maciez, sensibilidade), coloração do corpo, libertação de odores (Harris, 2003).

A pele é constituída por diversas camadas, que apresentam diferente composição e espessura (Figura 1; Figura 2). As camadas da pele são: epiderme, derme e hipoderme (Harris, 2003; Kermany, 2010; Welin-berger, 2001), havendo bibliografia que indica que a camada córnea também é considerada como uma camada diferenciada, embora por outros seja considerada como parte da epiderme (Benson & Watkinson, 2012).

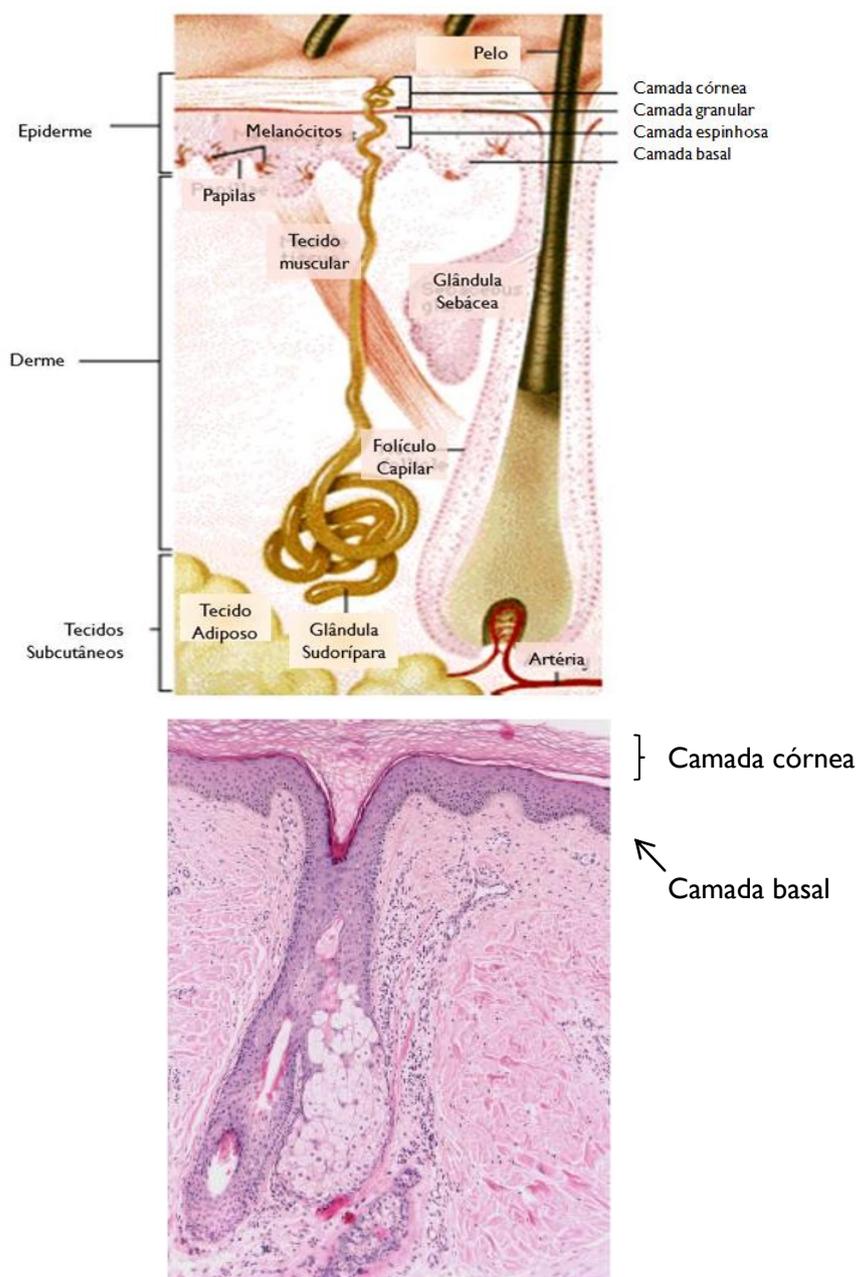


Figura 1: Esquema da estrutura da pele humana (cima – representação esquemática; baixo – corte histológico). (adaptado de Halldin, 2011; Welin-berger, 2001).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele e não possui tecido conjuntivo. Liga a pele aos tecidos subjacentes e é maioritariamente constituída por tecido adiposo (Harris, 2003; Johns Hopkins Medical Institutions, 2001). O tecido adiposo é responsável pela regulação e isolamento térmico do organismo e pode funcionar como fonte de energia (Harris, 2003).

A derme é a camada mais espessa (3-5mm) da pele e localiza-se logo acima da hipoderme. Tem carácter fibroelástico, pois é constituída por fibras de elastina assim como de colagénio e que delimitam a sua espessura (Kermány, 2010). Esta camada tem uma estrutura irregular pois contém os vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição da pele,

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais

nervos, glândulas sebáceas e folículos pilosos que são suportados por tecido conjuntivo (Kermany, 2010; Welin-berger, 2001). Como é uma camada bastante irrigada, a derme tem um papel fundamental na regulação da temperatura corporal (Kermany, 2010). As células da derme, bem como as das camadas mais profundas da epiderme são banhadas por fluido intersticial, sendo por isso, um ambiente hidrofílico (Welin-berger, 2001).

A epiderme é a camada mais externa da pele, com capacidade auto-regenerável. Encontra-se ligada à derme através de uma membrana basal, é estratificada, avascular, e na sua totalidade das multicamadas que apresenta uma espessura que varia entre 0,05 e 1mm, sendo que nas pálpebras é mais fina e nas palmas das mãos e plantas dos pés é mais espessa (Halldin, 2011; Welin-berger, 2001). Devido à ausência de capilares sanguíneos, a epiderme é nutrida através da rede capilar da derme. As suas camadas são compostas, maioritariamente, por queratinócitos (95%), melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans (Figura 2) (Halldin, 2011; Kermany, 2010).

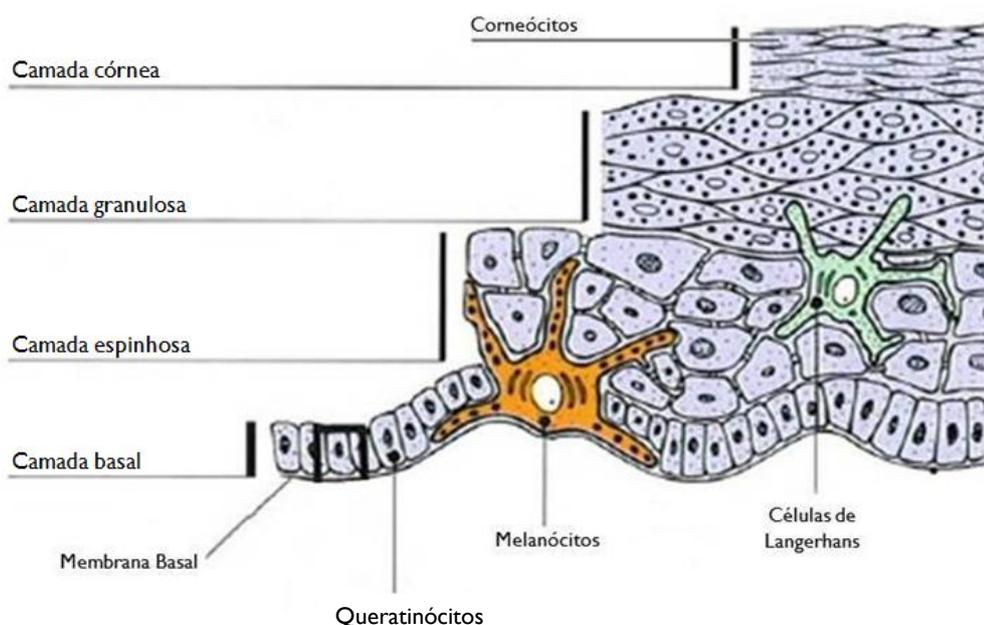


Figura 2: Camadas da epiderme (adaptado de Kermany, 2010).

Os melanócitos são fundamentais na constituição da pele pois contém melanina que tem a capacidade de proteger o ADN das células contra os danos causados pela radiação ultravioleta e também confere à pele a sua coloração. Os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme que é a camada mais interna da epiderme. Os queratinócitos são o principal tipo de células da epiderme. As células de Merkel são as principais constituintes da membrana basal, onde estão ligadas a terminais nervosos, tendo por isso uma função

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais sensorial. As células de Langerhans têm um papel fundamental nas reações imunológicas da pele e encontram-se na espinhosa e granulosa (Halldin, 2011; Kermany, 2010).

As células da camada basal estão alinhadas lado a lado numa única camada (Figura 2) e vão-se dividindo e diferenciando à medida que migram através das diferentes camadas da epiderme em direção à superfície num processo que conduz à regeneração da epiderme. Os queratinócitos, nos diferentes níveis de diferenciação, constituem as restantes camadas da epiderme (espinhosa, granulosa e córnea - Figura 2) (Halldin, 2011; Welin-berger, 2001).

A camada córnea presente na epiderme é constituída por várias camadas de células mortas, achatadas e queratinizadas – os corneócitos que correspondem ao último nível de diferenciação dos queratinócitos (Figura 2). Os corneócitos estão embebidos numa matriz lipídica que constitui cerca de 20% da camada córnea. A camada córnea constitui a principal barreira no que diz respeito à permeação de fármacos. Quando esta camada se encontra danificada há perda de fluidos corporais e o corpo fica mais suscetível a infeções microbianas levando a consequências graves no caso de não serem tratadas (Dew, 2011; Kermany, 2010).

A matriz intercelular da camada córnea é desprovida de fosfolípidos e é maioritariamente constituída por ceramidas (41%), colesterol (27%), ésteres de colesterol (10%) e ácidos gordos (9%). Por ter elevada percentagem de ceramidas (Figura 3), que tem cadeias longas, alifáticas e saturadas, a camada córnea, torna-se uma camada altamente ordenada e muito pouco permeável, o que fornece à pele resistência à entrada de substâncias estranhas no organismo (Welin-berger, 2001).

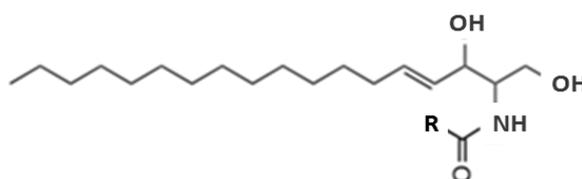


Figura 3: Estrutura de uma ceramida (adaptado de Garrett & Grisham, 2004).

Os apêndices da pele (foliculos piloso e glândulas sudoríparas) constituem cerca de 0,1% da sua superfície e são uma possível via de entrada de moléculas na pele (via transfolicular) (Suhonen, Bouwstra & Urtti, 1999). A principal via de permeação de compostos através da pele é a transepidérmica (permeação através da camada córnea) (Figura 4). Os compostos podem permear a camada córnea através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular, pela via **transcelular** ou através da matriz lipídica entre os corneócitos da pele, pela via **intercelular**. Embora a permeação, da maior parte dos compostos se realizar através da camada córnea, esta depende do seu tamanho molecular e

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais da sua lipofilicidade (Dew, 2011; Martins & Veiga, 2002). A via intercelular é a mais comum para as moléculas lipofílicas e pequenas (Dew, 2011).

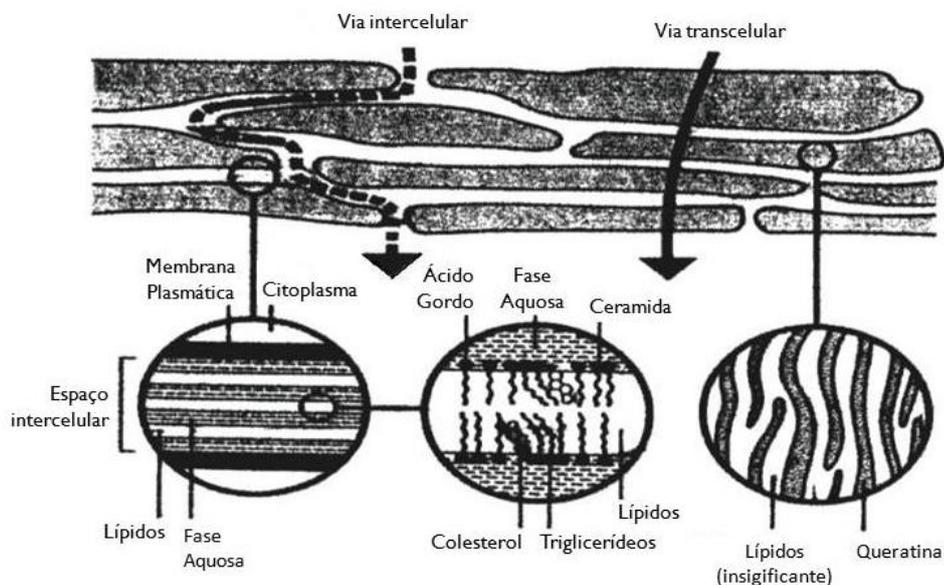


Figura 4: Representação das vias de permeação de fármacos através da camada córnea (via transepidérmica) (adaptado de Martins & Veiga, 2002).

Os fármacos podem ser administrados na pele para produzirem um efeito sistémico ou um efeito local (Ueda et al., 2009). No primeiro caso pretende-se que os fármacos atinjam a corrente sanguínea e daí cheguem ao local onde produziram o seu efeito terapêutico.

Quando se pretende que os fármacos tenham um efeito local são aplicados onde se pretende que produzam efeito terapêutico, como é o caso da aplicação de formas farmacêuticas tópicas na pele. Para uso tópico podem ser utilizadas diferentes formas farmacêuticas, que podem ser divididas, de acordo com as suas características, suspensões, soluções, formulações semissólidas (espumas, pastas, pomadas, géis, cremes, emulsões, microemulsões), formulações sólidas (pós e aerossóis) e *sprays* (Ueda et al., 2009).

2. A Dor e os Anestésicos

A dor é considerada por alguns autores (Pedroso & Celich, 2006; Sousa, 2002) como o quinto sentido, não descurando a temperatura, o pulso, a respiração e a pressão arterial, os cinco principais sinais vitais. A dor é subjetiva e pessoal, dependendo do sujeito a dor pode ser quantificada e qualificada de forma diferente, uma vez que também é afetada por fatores afetivo-motivacionais (atitudes, crenças e personalidades dos doentes) (Carr & Goudas, 1999; Sousa, 2002), em outras palavras, a dor é aquilo que o doente diz sentir.

A dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é definida como ‘uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial de tecidos, ou descrita em termos de tal dano’ (Bogduk & Merskey, 1994).

O sistema nociceptivo é responsável pela ‘medição’ da dor, juntamente com o sistema emocional que também influencia esta perceção (Halldin, 2011).

Podem ser diferenciados dois tipos de dor, a dor aguda e a dor crónica, de acordo com a sua duração. A dor aguda sente-se quando há uma resposta imediata a um contacto com uma substância química estranha, a um estímulo térmico ou mecânico associados a uma cirurgia, um trauma ou a uma doença aguda (Carr & Goudas, 1999), estando associada a um dano real ou potencial nos tecidos (Sousa, 2002).

A dor não é simplesmente o produto final de um sistema de transmissão sensorial linear, é antes um processo dinâmico que envolve interações contínuas dentro de um sistema complexo ascendente e descendente (Joel & Melzack, 1999).

Uma das funções da pele é a receção da sensação de toque na medida em que aí se localizam diversos tipos de recetores táteis. Esse estímulo é depois transmitido através do sistema nervoso, uma vez que na derme estão presentes nervos que fazem a sua condução.

Existem diversas doenças associadas à pele, ou tratamentos que devido à sua natureza causam dor e desconforto. Desta forma torna-se necessário a utilização de fármacos (anestésicos) que através da sua aplicação tópica consigam reduzir ou eliminar a dor local associada a certos procedimentos (ex: pequenas cirurgias, tratamentos de doenças da pele, remoção ou aplicação de tatuagens, pequenas incisões na pele,...). De entre os diversos tipos de anestésicos, os anestésicos locais são capazes de reduzir a dor local e são bastante seguros. Alguns exemplos são a xilocaína, a ropivacaína, a bupivacaína (Carr & Goudas, 1999), a benzocaína, a tetracaína, a lidocaína (Figura 5) e a prilocaína (Halldin, 2011). Estes fármacos podem ser usados sozinhos ou em combinação de mais do que um, como são os casos das combinações lidocaína/prilocaína e lidocaína/tetracaína.

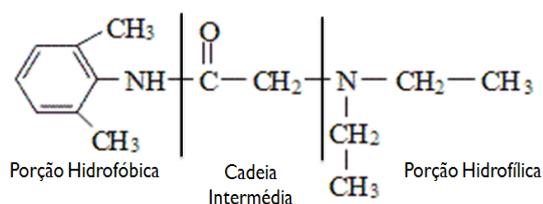


Figura 5: Estrutura química da lidocaína (Nogueira, Montanari & Donnici, 2009).

Os anestésicos locais, normalmente são utilizados na forma de gel e nem sempre demonstram a eficácia desejada em alguns tratamentos (Halldin, 2011). Os anestésicos locais atuam na pele intacta provocando um bloqueio dos impulsos nervosos impedindo assim que a dor chegue ao cérebro através das fibras nervosas (Friedman et al., 2001; Silva, 2009; Welin-berger, 2001). Para tal, o fármaco tem que ser capaz de chegar ao local onde se pretende que produza a ação, numa dose suficiente para atingir o efeito terapêutico sem produzir efeitos secundários (Silva, 2009). Desta forma, as suas características estruturais, como a lipofilicidade, o tamanho da molécula, a duração da ação, a toxicidade, devem ser tidas em conta de forma a terem o máximo de eficácia, pois são fatores que influenciam a sua capacidade de chegar ao local de ação e produzirem o efeito terapêutico. Em média os anestésicos locais têm um pKa entre 7.5 e 9.5 e um peso molecular a rondar os 300g/mol. Os anestésicos locais na forma base formam sais, que são bem definidos e estáveis (Welin-berger, 2001).

3. Formulações tópicas para administração de fármacos

Inicialmente pensava-se que a pele era impermeável a substâncias químicas exógenas ao organismo humano (Welin-berger, 2001), pelo que se julgava impossível a administração de fármacos por esta via, apenas sendo aplicados medicamentos em lesões expostas da pele. Mas ao longo dos tempos tem-se vindo a verificar que tal administração é possível e que a pele apresenta inúmeras vantagens como via de administração de medicamentos.

A entrada ou não dos fármacos na pele depende de múltiplos fatores. As propriedades físico-químicas dos fármacos (ex: estrutura, tamanho, lipofilicidade) são dos fatores mais determinantes, no entanto, os restantes componentes da formulação também podem desempenhar um papel muito importante na modulação da absorção e permeação dos fármacos através da pele (Dew, 2011).

No caso específico das formulações para aplicação tópica de anestésicos na pele estas deverão ter um início de ação rápido, atuar com profundidade e duração suficientes, também devem ser de fácil aplicação, aderir facilmente ao local de aplicação, não devem ser irritantes e em condições normais de armazenamento devem ser estáveis (Welin-berger, 2001).

Como já foi referido anteriormente, a principal barreira à entrada de fármacos na pele é a camada córnea, sendo considerado que a parte do anestésico, responsável pela sua entrada e consequente capacidade de penetrar na pele é a aromática (Figura 5), pois ela solubiliza-se no meio dos lípidos da camada córnea (via transepidérmica) e permite ainda a sua difusão através da membrana das células nervosas. No que diz respeito ao efeito dos fármacos, ele é influenciado tanto pela parte aromática como pela amina são determinantes na ligação com as proteínas e por isso são elas que determinam o tempo de duração da anestesia (Friedman et al., 2001).

Os estudos de libertação dos fármacos da formulação e os estudos de permeação através da pele são feitos inicialmente *in vitro* utilizando membranas sintéticas no primeiro caso e pele humana ou de animais no segundo caso, embora no final e para ser feita uma avaliação mais realista da entrega tópica dos fármacos devam ser efetuados estudos *in vivo* em humanos. Existem vários tipos de formulações para administração tópica de fármacos: colóides, cremes, emulsões, microemulsões, géis, loções, aerossóis, soluções e pomadas.

As pomadas são formulações semissólidas, destinadas à aplicação externa na pele e em mucosas, que normalmente contém menos do que 20% de água e compostos voláteis e contém mais do que 50% de hidrocarbonetos, ceras ou polióis como veículo (base). Sendo a sua base hidrocarbonetos, apenas uma pequena quantidade de um componente aquoso pode

ser inserida, estas bases são vantajosas pois permitem manter os fármacos em contacto com a pele durante mais tempo e atuam do mesmo modo que um penso oclusivo; por outro lado são mais difíceis de lavar. A escolha da base para uma pomada depende da ação que se pretende, do tipo de substância ativa a incorporar, do tipo de espalhamento, da sua estabilidade e de possíveis características que se desejem no produto final (USP, 2009b).

Os géis são também formas farmacêuticas semissólidas, compostos por pequenas partículas inorgânicas ou grandes moléculas orgânicas preenchidas por um líquido (USP, 2009a). A sua fase contínua é responsável pela sua estrutura sólida e, dependendo dos seus constituintes, os géis podem ser opacos ou transparentes, polares ou não polares. Os géis mais simples são compostos por água gelificada com uma goma natural (ex: goma xantana), um polímero semissintético (ex: metilcelulose) ou sintético (ex: carbómeros – polímeros de carboxivinil) (Walters, 2002).

Os cremes são formas farmacêuticas semissólidas e contêm fármacos dissolvidos ou dispersos numa base, a sua consistência de espalhamento deve-se à sua formulação ser constituída por uma fase oleosa e outra aquosa na forma de óleo em água (o/w) ou água em óleo (w/o). Mais recentemente o termo creme tem vindo a ser mais aplicado a emulsões óleo em água ou a soluções aquosas microcristalinas de ácidos gordos de cadeia longa ou álcoois que são laváveis da roupa ou da pele e mais aceitáveis, ao nível estético e cosmético, pelo utilizador (USP, 2009b).

As emulsões são sistemas multifásicos em que um ou mais líquidos estão dispersos noutra líquido imiscível na forma de pequenas gotas. Quando o óleo é a fase dispersa e uma solução aquosa é a fase contínua designa-se por emulsão do tipo o/w. Contudo quando água ou uma solução aquosa está dispersa numa fase contínua oleosa denomina-se de emulsão w/o. Para que a emulsão seja estável são utilizados agentes emulsificadores (surfatantes) que previnem a coalescência, isto é, a junção das gotículas da fase descontínua umas às outras, formando gotículas de maior tamanho até formar uma única fase, ficando assim duas fases contínuas separadas na emulsão. Os surfatantes fornecem uma barreira física que reduz a tensão interfacial entre as duas fases facilitando a formação das pequenas gotas quando se mistura a formulação. No caso de se poder aplicar o termo creme ou pomada, estes são preferidos à utilização de emulsão (USP, 2009b).

3.1 Microemulsões

Tanto as emulsões como as microemulsões são dispersões de o/w ou w/o. As emulsões são estáveis em termos cinéticos mas não em termos termodinâmicos. Por outro lado, as microemulsões são dispersões termodinamicamente e cineticamente estáveis de dois líquidos imiscíveis, em que a fase dispersa é constituída por gotículas de tamanho nanométrico (diâmetro na gama dos 5-100nm). Assim, as microemulsões são ainda constituídas por um surfatante, associado ou não a um co-surfatante (geralmente um álcool de cadeia curta) que são responsáveis pela estabilidade das microemulsões (Kahle & Foley, 2006). Estes três componentes (óleo, surfatante e co-surfatante) combinados em proporções rigorosas formam espontaneamente um líquido transparente ou translúcido com características bem definidas, como a estabilidade termodinâmica, facilidade de preparação, transparência, baixa viscosidade, que tem potencial para ser utilizado na entrega de fármacos com diferentes tipos de solubilidade (Djordjevic et al., 2004; Lawrence & Rees, 2000; Mehta, Kaur & Bhasin, 2010; Zachar, 2010).

Estes sistemas têm-se vindo a mostrar mais vantajosos que as emulsões para o uso farmacêutico pois permitem a administração de diferentes tipos de fármacos e diferentes tipos de administração, desde a oral, tópica, parentérica, ocular, periodontal, bucal até à nasal (Mcevoy, 2008; Zachar, 2010). Em relação à administração na pele, as microemulsões apresentam vantagens em relação às emulsões na medida em que a pele é composta por queratinócitos rodeados por uma matriz lípica que a tornam quase impermeável e as microemulsões apresentam um grande poder solubilizante, graças ao surfatante e co-surfatante da sua composição, são capazes de contribuir para a redução da barreira da pele à penetração dos fármacos (Hua et al., 2004; Zachar, 2010). As microemulsões são também preferíveis devido à sua grande capacidade de armazenamento de fármacos por causa da sua fase dispersa que pode atuar como um reservatório, tornando possível manter um gradiente da concentração quase constante na pele durante algum tempo favorecendo a permeação dos fármacos através da pele (Hua et al., 2004).

Uma das formas de caracterizar este tipo de sistemas e de verificar a sua evolução ao longo do tempo é pela distinção das suas fases, que podem ser monitorizadas quantitativamente pela medição da condutividade elétrica e das propriedades reológicas do sistema (Djordjevic et al., 2004; Mehta, Kaur & Bhasin, 2010; Zachar, 2010). Desta forma podem-se distinguir as microemulsões o/w, w/o e as bicontínuas, normalmente a fase que

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais apresenta o maior volume designa-se por contínua (Figura 6) (Libster, Aserin & Garti, 2006; Mehta, Kaur & Bhasin, 2010).

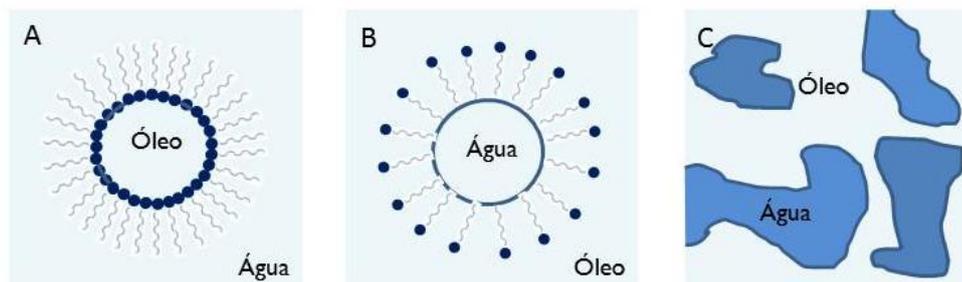


Figura 6: Esquema representativo da estrutura dos diferentes sistemas de microemulsões. A: Microemulsão o/w; B: Microemulsão w/o; C: Microemulsão bicontínua (adaptado de Lawrence & Rees, 2000).

É o reduzido tamanho das partículas das microemulsões (Polizelli et al., 2006; Zachar, 2010) que justifica o seu aspeto transparente ou translúcido (Polizelli et al., 2006). O aspeto de uma microemulsão a olho nu é homogéneo (Zachar, 2010).

No caso de ser uma microemulsão do tipo o/w (Figura 6 – A) as gotículas de óleo apresentam-se rodeadas por um surfatante (juntamente com o seu co-surfatante quando este se encontra presente) formando uma película em torno da fase interna que se encontra dispersa na fase aquosa, a fase contínua (Zachar, 2010). No entanto, a adição de um surfatante, a única forma de obter sistemas estáveis, pode apresentar algumas desvantagens pois, em grandes quantidades, podem provocar irritação da pele (Podlogar et al., 2004); problema que pode ser resolvido com a adição de um co-surfatante (Djordjevic et al., 2004). O co-surfatante vai reduzir a tensão interfacial existente entre o óleo e o surfatante pois uma parte da molécula é hidrofóbica e outra é hidrofílica (Kahle & Foley 2006; Zachar 2010) e normalmente são álcoois de cadeia intermédia (Mcevoy, 2008). Estes sistemas são vantajosos para fármacos hidrofóbicos pois desta forma ficam retidos nas gotículas de óleo, não estando em contato com a fase contínua aquosa (Podlogar et al., 2004; Zachar, 2010). Quando um sistema apresenta elevado teor de água, a absorção percutânea do fármaco pode aumentar devido ao efeito de hidratação da camada córnea (Hua et al., 2004) que é um fator conhecido por favorecer a permeação cutânea.

Se há um equilíbrio entre duas fases contínuas, uma fase oleosa e uma fase aquosa, então estamos perante um sistema bicontínuo (Figura 6 – C). Os sistemas bicontínuos apresentam um comportamento plástico que é bastante vantajoso para administração intravenosa e tópica (Zachar, 2010).

O tipo de surfatante utilizado no sistema para formar uma emulsão é o fator determinante para o tipo de fase contínua que irá estar presente. No caso de ser utilizado um surfatante hidrofílico, o óleo vai ser emulsionado na forma de gotas ao longo da fase contínua, água; no caso de o surfatante ser lipofílico pequenas gotículas de água ficam dispersas na fase contínua oleosa (Zachar, 2010).

Em relação às propriedades reológicas do sistema, as microemulsões normalmente apresentam baixas viscosidades, próximas das da água, mesmo quando se encontram na formulação elevadas quantidades de gotículas. Apresentam também as características de um fluido newtoniano, isto é, o seu fluxo manter-se-á constante quando sujeito a diferentes taxas de cisalhamento, embora as microemulsões na forma bicontínua não apresentem este tipo de comportamento podendo exibir alguma plasticidade (Zachar, 2010).

De forma a melhorar as propriedades reológicas deste tipo de sistemas de entrega de fármacos podem ser adicionados gelificantes que lhes conferem propriedades reológicas ideais. Deste modo as microemulsões passam a ter uma rede polimérica que em meio aquoso gelifica concedendo-lhes a viscosidade desejada.

A rede polimérica que se forma na microemulsão, aproxima-a de um hidrogel e pode ser constituída por diversos materiais, como por exemplo os polímeros de ácidos acrílicos, também conhecidos como carbómeros (Chopra et al., 2007; Rowe, Sheskey & Quinn, 2009). Estes polímeros apresentam algumas das características que são requisito para materiais bioadesivos, como grupos de ligação de hidrogénio (OH e COOH), fortes cargas aniónicas, flexibilidade, elevado peso molecular, capacidade de hidratação rápida que permitirá a interação de polímeros adjacentes que é necessário para a adesão (Chopra et al., 2007). Os carbómeros são moléculas sintéticas que, no estado seco, estão enroladas firmemente, mas, quando dispersas em água, começam a hidratar e desenrolar parcialmente, expondo as suas porções ácidas livres.

Os hidrogéis com carbómeros estão documentados e aprovados para o uso farmacêutico através de diferentes vias de administração (Contreras & Sánchez, 2002a; Merclin, Bramer & Edsman, 2004). Este tipo de polímeros é vantajoso pois confere ao gel boas propriedades reológicas resultando de uma acumulação na zona em que é aplicada permitindo longos tempos de contacto da formulação com a zona de aplicação, sendo por isso uma boa alternativa às formulações com base de óleo e também têm boa capacidade em manter o pH desejado (Merclin, Bramer & Edsman, 2004).

Para aumentar a viscosidade das formulações também pode ser utilizada a goma xantana, que é desde 1980 aprovada para uso como espessante e estabilizador (Katzbauer,

1998). Este polissacarídeo, de origem microbiana, que também é muito utilizado na indústria alimentar, é bastante solúvel em água, ainda que necessite de forte agitação para ser introduzido num meio aquoso de forma a evitar a formação de grumos (Katzbauer, 1998; Papalamprou et al., 2005). A estrutura formada pela goma é do tipo de gel embora, ao contrário da formada pelo carbómero, seja mais fraca (Hennoek, Rahalkar & Richmond, 1984; Papalamprou et al., 2005).

Uma estrutura do tipo hidrogel é vantajosa pois o tempo de permanência no local de aplicação é maior do que quando é utilizada uma solução aquosa, pois a capacidade adesiva de um hidrogel é maior (Dew, 2011). Deste modo como há maior tempo de contacto há maior absorção do fármaco o que torna possível diminuir a dose administrada e usar maiores intervalos entre administrações, assim tendo mais características a seu favor torna-se mais fácil a aceitação por parte do doente (Dew, 2011).

O facto de se ter uma estrutura de hidrogel permite ter pouca quantidade de óleo, fazendo com que este seja uma forma de dosagem mais vantajosa, quando comparada com cremes e pomadas, pois não se torna tão oclusiva quanto uma pomada (Dew, 2011; Peppas et al., 2000). Existem diversos fatores que afetam a capacidade de absorção de água de um hidrogel, por exemplo o pH, a força iónica a temperatura e a radiação eletromagnética, havendo a capacidade de um hidrogel ser dependente de diferentes fatores (Peppas et al., 2000).

3.2 Formulações comerciais de anestésicos tópicos

A lidocaína é uma amina ligada a um anel aromático que contém um grupo amida (Figura 7) (Silva, 2009) e é utilizada em diversas formulações comerciais como anestésico local (Infarmed, 2013).

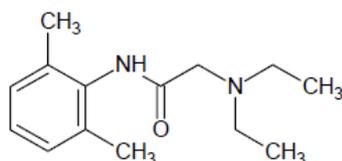


Figura 7: Estrutura Química da Lidocaína (Quality of Medicines, 2010).

A prilocaína, também denominada de procaína, é um anestésico do tipo aminoamida (Figura 8) também conhecido como procaína e é muito utilizado na medicina dentária.

Quando associada a um vasoconstritor pode aumentar o tempo de efeito da anestesia, embora a utilização de vasoconstritores seja desaconselhada (Cereda et al., 2004).

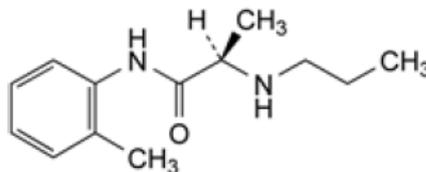


Figura 8: Estrutura Química da Prilocaína (Quality of Medicines, 2010).

Atualmente, o desenvolvimento de novas formulações comerciais que aumentem o tempo de duração do efeito anestésico e o seu rápido início de ação continua a ser um desafio para o desenvolvimento farmacêutico (Cereda et al., 2004).

O EMLA® é um medicamento atualmente comercializado que consiste numa emulsão o/w que contém uma mistura eutética dos anestésicos locais lidocaína e prilocaína, ambos na forma de base, na quantidade de 25mg/g e na proporção de 1:1 (AstraZeneca, 2010a; Friedman et al., 2001; Welin-berger, 2001). Apresenta-se na forma de bisnaga de 5g e 30g comercializada pela AstraZeneca (Figura 9) e também na forma de sistema bioadesivo com a mesma dosagem (Infarmed, 2013). A mistura eutética forma-se com a mistura da lidocaína e prilocaína na forma base na proporção de 1:1 o que faz com que o ponto de fusão da mistura seja inferior ao ponto de fusão dos dois anestésicos separados (Friedman et al., 2001; Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994). Esta combinação de anestésicos é líquida à temperatura ambiente enquanto ambos anestésicos são sólidos à temperatura ambiente quando separados (Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994). A esta mistura eutética dos dois anestésicos é adicionado um emulsificante e também um óleo, formando então a emulsão o/w que constitui o EMLA® (Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994). A mistura contém também uma agente gelificante, o carbómero (Carbopol®) que lhe confere as suas boas propriedades reológicas (Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994).



Figura 9: EMLA creme em bisnaga de 30g (Drugs Information Online, n.d.).

Em 1996, quando foi autorizada a sua introdução no mercado, veio colmatar as necessidades existentes em relação à anestesia de pele intata (Welin-berger, 2001).

O EMLA® é utilizado em vários procedimentos, sobretudo em pediatria na aplicação de punções venosas e em canulações arteriais e venosas (Ohzeki et al., 2008). Nos adultos verificou-se que a utilização do EMLA® possuía muitas vantagens em relação à anestesia por infiltração de lidocaína (Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994). Também é usado para procedimentos como punções lombares e injeções epidurais; injeções de fármacos e para outros procedimentos que necessitem de agulhas, como é o caso de biópsias e eletromiografias (AstraZeneca, 2010a; Friedman et al., 2001; Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994). Mais ainda, o EMLA também é referenciado para o uso em remoção de tatuagens e em outros procedimentos cosméticos que envolvam laser (Friedman et al., 2001).

O uso de EMLA® em pequenas cirurgias mostra-se eficaz quando aplicado 90 minutos antes do procedimento, por exemplo cirurgias geniturinárias, aos ouvidos, nariz, garganta e orais e também no tratamento de cálculos renais e biliares (Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994).

A aplicação do creme está associada à utilização de um penso oclusivo (Figura 10) que deve ser colocado sobre a emulsão aplicada na área da pele a tratar. Esta aplicação deve ser realizada no mínimo uma hora antes do procedimento a efetuar (Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994). Após a obtenção do efeito desejado é feita a remoção da emulsão e do seu penso oclusivo. O efeito anestésico local mantém-se durante cerca de 60 minutos após remoção do creme pois forma-se um reservatório do anestésico na camada córnea durante a oclusão. Desta forma a difusão dos anestésicos através da camada córnea continua e chegam aos nervos sensoriais localizados na derme. O tempo de aplicação necessário para se atingir o efeito anestésico do EMLA® na pele é demasiado elevado em todos os casos (90 minutos) mas tem particular relevância em doentes pediátricos (Friedman et al., 2001).



Figura 10: Aplicação de EMLA na mão utilizando um penso oclusivo (Kundu & Achar, 2002).

Já foram observados alguns efeitos adversos deste medicamento em adultos, ainda que sejam restritos ao local de aplicação e de curta duração (Friedman et al., 2001; Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994). Estão enumerados casos de vermelhidão, ou branqueamento, por causa da vasoconstrição que é observada 1,5 horas após aplicação, seguida de vasodilatação por 2 ou 3 horas (Friedman et al., 2001). Também já foram relatados casos de prurido, queimadura e ardor, ainda que casos de reações alérgicas não tenham sido verificados (Friedman et al., 2001; Gajraj, Pennant & Mehernoor, 1994).

Devem ser tidos cuidados adicionais quando o creme é aplicado próximo aos olhos, pois devido a ter na sua composição hidróxido de sódio, para ajustar o pH próximo de 9, podem ocorrer lesões no olho, nomeadamente abrasão da córnea ou úlceras (Friedman et al., 2001).

3.3 Estudos de caracterização das formulações tópicas

Ao desenvolver qualquer forma farmacêutica têm que ser controlados diversos fatores e características que são críticas para o desempenho e qualidade das formulações (qualidade crítica dos produtos).

Alguns dos parâmetros que são analisados nas formulações semissólidas para aplicação tópica são as propriedades reológicas do sistema, o espalhamento e a transparência (Contreras & Sánchez, 2002b). Estas propriedades são determinantes para a aceitação ou rejeição do medicamento por parte do utilizador.

Segundo a Farmacopeia dos Estados Unidos da América (USP) (Ueda et al., 2009) devem ser realizados diferentes testes para avaliação da qualidade dos produtos para

aplicação tópica, tais como, uniformidade de conteúdo, impurezas, pH, teor de água, limites microbianos, esterilidade e conteúdo antioxidante. Para além destes, também devem ser realizados testes específicos para as formulações de aplicação tópica, como viscosidade, uniformidade de conteúdo da embalagem e tamanho de partícula, quando se refere ao produto final.

A determinação das propriedades reológicas das formas farmacêuticas semissólidas é muito importante para o desenvolvimento tecnológico pois as suas características reológicas podem influenciar a estabilidade física do sistema, afetar o seu desempenho, a sua capacidade de entrega de fármacos e as características sensoriais. Formulações com viscosidade elevada podem apresentar altas taxas de difusão, quando comparados com outros com viscosidade mais baixa (Ueda et al., 2009). Esta característica é grandemente influenciada por fatores como, a estrutura física interna do produto, a amostragem do produto, a temperatura em que é analisado, o tamanho e forma do recipiente e o método utilizado na medição da viscosidade (Ueda et al., 2009). O estudo do comportamento reológico pode contribuir para a avaliação da influência do processo de fabrico e reduzir o tempo de estudos de pré-formulação.

A caracterização reológica das formulações fornece informações valiosas sobre a sua estrutura e a sua viscosidade, isto é, a sua resistência ao fluxo. Este fator é importante no que diz respeito à caracterização da estabilidade física da formulação e do seu comportamento no local de aplicação (Welin-berger, 2001). Em formulações com menor viscosidade o seu comportamento é condicionado pelas características da fase contínua, apresentando por vezes comportamento newtoniano, isto é, apresenta taxas de cisalhamento proporcionais às tensões de cisalhamento aplicadas. No entanto, este comportamento, e conseqüentemente, a sua viscosidade possam ser alterados com a adição de polímeros formadores de géis (ex: goma xantana; carbómero) (Welin-berger, 2001).

Quando é estudada a reologia de um fluido e de forma a estudar o seu comportamento é aplicada a Lei de Newton (Equação 1), que tem em conta a tensão de cisalhamento (τ , Pa) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) aplicadas que se relacionam proporcionalmente dando origem à viscosidade (η , Pa.s) conseguindo assim determinar o comportamento de um fluido face à aplicação de diferentes tensões. Esta lei permite caracterizar fluidos viscosos não elásticos. Os fluidos newtonianos que apresentam uma relação linear entre taxa e tensão de cisalhamento denominam-se de newtonianos e os que não apresentam são não-newtonianos, pois alteram a sua viscosidade em função da taxa e

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais
tensão que lhes são aplicadas. Como exemplo dos fluidos newtonianos temos o caso dos
géis (Welin-berger, 2001).

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma}$$

Equação 1: Lei de Newton.

Os testes reológicos são efetuados para verificar o modo como um fluido se comporta quando lhe é aplicada uma tensão, por exemplo, a força aplicada ao espalhá-lo na pele.

O método utilizado na caracterização da viscosidade da formulação depende muito do tipo de formulação a ser analisada, por isso, existem diferentes tipos de geometria do viscosímetro ou reómetro, os cilindros concêntricos, o cone-prato e o prato-prato; os cilindros são utilizados para análise de amostras fluidas com grande escoamento, ao passo que os sistemas cone-prato e prato-prato (Figura 11) são usados para amostras mais pequenas e com maior viscosidade e menor fluidez (Ueda et al., 2009). Os reómetros são os mais utilizados para a caracterização de microemulsões e são constituídos por uma parte móvel e outra fixa (Zachar, 2010).



Figura 11: Reómetro equipado com o sistema prato-prato (Sabadini, n.d.).

A temperatura é um dos fatores cruciais neste tipo de análises, sendo por isso necessário controlá-la com precisão durante o ensaio reológico. Deve-se também avaliar o comportamento reológico à temperatura do local onde se destina a aplicação, por exemplo a temperatura da pele no caso de aplicação tópica (Ueda et al., 2009). Deste modo este equipamento tem acoplado a si um banho com temperatura controlada que permite ajustar a temperatura do teste à condição a simular.

As propriedades reológicas de um sistema fornecem informações acerca da sua estrutura, assim as microemulsões do tipo o/w ou w/o apresentam um comportamento newtoniano, variando a tensão de cisalhamento de forma linear quando aplicadas diferentes taxas de cisalhamento (Zachar, 2010). A viscosidade de uma microemulsão o/w na ausência de um agente gelificante é geralmente próxima da água, enquanto que nos sistemas de w/o, há aumento da viscosidade com o aumento da concentração de água, presumivelmente devido ao aumento do tamanho das gotículas de água, embora, ainda assim, apresentem baixas viscosidades (Zachar, 2010). A variação da viscosidade das microemulsões que não apresentam qualquer tipo de agente gelificante também se pode dever a outros aspetos da microestrutura da formulação, como é o caso do tipo e da forma dos agregados, da concentração dos seus componentes e das interações entre si, deste modo a viscosidade pode ser utilizada como meio de controlar as alterações na estrutura do sistema (Libster, Aserin & Garti, 2006).

Assim como a viscosidade, a condutividade é outro dos parâmetros que pode auxiliar a caracterização de formulações. A condutividade é muito útil na caracterização de formulações permitindo determinar qual a fase contínua presente. Os valores de condutividade são bastantes diversificados para uma microemulsão w/o ou para o/w. Para microemulsões w/o os valores de condutividade são mais baixos, devido ao facto da água ser melhor condutora do que o óleo, que é a fase contínua, e a água está presente em forma de gotas, deste modo a microemulsão apresenta o valor de condutividade do óleo que é baixo (Zachar, 2010). Assim como a concentração da água, também os diferentes componentes podem fazer variar a condutividade (Zachar, 2010).

O pH das formulações tópicas também deve ser determinado porque permite avaliar a estabilidade da formulação ao longo do tempo e deve ser próximo do pH normal da pele (5-6,5) de forma a assegurar que não provoca irritação da pele (Benson & Watkinson, 2012). A medição do pH neste tipo de formulações é difícil e demorado porque este tipo de formulações não contém uma grande quantidade de água (Ueda et al., 2009).

Outro dos testes recomendado pela USP para testar o desempenho dos medicamentos para aplicação tópica é a medição da liberação do fármaco do produto final, pois estes valores são importantes para o desenvolvimento de um produto, para a sua aprovação pelo controlo de qualidade quando comparados com produtos de referência (Ueda et al., 2009).

Os ensaios de liberação de fármacos a partir de formulações semissólidas podem ser realizados recorrendo a células de difusão verticais. Um dos tipos de células de difusão vertical mais utilizados são as células de Franz (Figura 12) (USP, 2009a).



Figura 12: Esquema das células de Franz (Silva et al., 2010).

Estas células possuem um compartimento doador e um compartimento recetor que são separados por um orifício de diâmetro variável, onde é colocada uma membrana sintética que deve ser altamente permeável e servir como suporte e divisão entre a formulação em avaliação e o meio recetor, devendo ser por isso inerte e oferecer o mínimo de resistência à passagem do fármaco de um compartimento para o outro. Os testes devem ser efetuados num banho a 37°C que garanta que a solução tampão do compartimento recetor se mantenha a 32°C (temperatura fisiológica da pele) e a amostragem deve ser feita até 5 horas repondo o meio que é recolhido para análise com meio fresco (Ueda et al., 2009; Welin-berger, 2001).

As células operam em conjuntos de seis e consistem num compartimento onde está o meio recetor, sobre o qual é colocado a membrana com uma anilha e a tampa (que contém a formulação), seguros por uma mola (Figura 12) (Silva et al., 2010). O principal material de que são compostas as células é vidro de borossilicato, embora outros materiais também possam ser usados quer na célula, quer em outros constituintes das células, ainda

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais
que nenhum dos materiais dava reagir ou absorver o produto que está a ser testado (USP, 2009a).

A solução tampão utilizada deve ter elevada capacidade de solubilização do fármaco a testar e a quantidade de fármaco libertado para este meio nunca deve ultrapassar 10 a 20% da solubilidade do fármaco nesse meio de forma a serem asseguradas as *sink conditions* durante todo o ensaio (Brown et al., 2004; Gibaldi & Feldman, 1967). Sendo assim a quantidade de amostra a ser analisada deve ser entre 200 e 400 mg de creme, pomada ou gel, que deve estar homogeneamente espalhada sobre a membrana (USP, 2009a).

As alíquotas recolhidas das células são analisadas por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) para determinação da quantidade ou percentagem (%) de fármaco libertado ao longo do tempo da formulação (Silva et al., 2010).

4. Desenho de Experiências, *Quality by Design* e *Target Product Profile*

Em estudos iniciais de investigação de um novo produto ou processo, é grande o desconhecimento das características que influenciam a qualidade do produto ou o processo de preparação ou fabrico. Por este motivo, tem-se vindo a utilizar cada vez mais, nas últimas duas décadas, o desenho de experiências para obter respostas mais concisas e fiáveis (Contreras & Sánchez, 2002a), em vez do tradicional método de tentativa-erro.

O desenho de experiências, DoE, é uma metodologia estatística que permite estudar, de forma controlada, vários fatores em simultâneo (variáveis independentes) e respetivas interações entre eles, cada um com mais do que um nível, permitindo identificar a melhor combinação de níveis para cada fator para se obterem as respostas pretendidas (variáveis dependentes) (Delgado, 2012). Depois da realização das experiências utiliza-se a análise de variância para o tratamento estatístico dos resultados obtidos que permite identificar, de forma objetiva, quais os fatores e/ou interações que afetam significativamente as respostas.

Com o auxílio desta ferramenta poupa-se tempo e recursos, que podem ser utilizados posteriormente para otimizar a formulação (SAS Institute, 2013), assim como se consegue reduzir:

- a) a variabilidade do processo de forma a obter resultados mais concordantes;
- b) os erros;
- c) o número de experiências;
- d) a perda de informação e ainda se melhora o rendimento do processo (Alberto, 2013; Silva, 2012).

O DoE é usado com diversos objetivos, como fazer a triagem dos fatores importantes para o produto/processo que se está a estudar, desenvolver ou melhorar um novo produto ou processo, otimizar a qualidade e o desempenho de um produto ou de um procedimento de fabrico, minimizar os custos de produção e os resíduos produzidos e testar a robustez de produtos e processos (Eriksson et al., 2008). Segundo Shihhare & Mccreath (2010) o facto de se utilizar o DoE faz com que a experiência seja mais rápida e permite retornos 4 a 8 vezes maiores do que o custo de executar as experiências de modo aleatório e variando um fator de cada vez (método de tentativa-erro).

Hoje em dia, o DoE é utilizado em variados setores, desde a indústria química e de polímeros, à indústria automóvel e farmacêutica, em biotecnologia, na siderurgia e minas, na indústria dos plásticos e tintas até à indústria alimentar e do papel (Eriksson et al., 2008). É

também aplicada em várias ciências: física, engenharia, sociologia, psicologia, medicina, genética, entre outras (Alberto, 2013). O DoE é usado basicamente em três tipos de análises, *screening*, otimização e robustez. As análises de *screening* servem para identificar qual/quais o(s) fator(es) ou a interação entre eles que mais influenciam de forma estatisticamente significativa uma resposta e são o tipo de análises que se realizam quando há maior desconhecimento sobre o produto ou o processo. Quando já se conhecem estes fatores podem realizar-se estudos de otimização que permitem definir a combinação de fatores e os seus níveis (valores) que são mais vantajosos para alcançar os objetivos da experiência (condições ótimas). Finalmente, os testes de robustez permitem determinar a sensibilidade do produto ou processo em relação a pequenas alterações que possam surgir (Eriksson et al., 2008).

Os princípios básicos do DoE são a replicação, a aleatoriedade e a partição em blocos. A réplica consiste na execução de um teste várias vezes para obter a estimativa do erro experimental e para verificar o efeito de cada fator mais precisamente (Alberto, 2013). Quantas mais vezes for repetida a experiência mais fiável se torna o modelo, no entanto a repetição de todas as experiências pode acarretar grandes custos, pelo que por prática comum apenas os pontos centrais são repetidos (Shivhare & McCreath, 2010). A aleatoriedade é uma das exigências do DoE que garante que a sequência das análises e a escolha dos materiais é de carácter aleatório e ainda diminui o ruído que possa existir (Alberto, 2013; Shivhare & McCreath, 2010). Por fim a partição em blocos é útil para controlar e avaliar a variabilidade dos vários fatores, permitindo o aumento da precisão do método (Alberto, 2013).

No entanto, para que o DoE consiga atingir os seus objetivos é necessário que antes de se começar qualquer experiência se siga uma abordagem sistemática que deve incluir a definição dos objetivos da experiência, análise da informação ou conhecimento prévio do produto e/ou do processo, seleção dos fatores a variar e respetivos níveis de acordo com essa informação; seleção dos fatores que permanecerão constantes; definição do número de experiências, do número de repetições e das respostas que se vão avaliar (Silva, 2012). É de ter em conta que quem define os intervalos de cada um dos fatores e as respostas pretendidas, é o utilizador, para isso é importante que as escolhas sejam baseadas em pesquisa bibliográfica e dados científicos e que não sejam escolhidos ao acaso, de forma a alcançar uma zona de trabalho adequada e que forneça dados precisos e fiáveis (Alberto, 2013).

Todo o processo de escolha das experiências a realizar, das melhores repetições, análise dos resultados por métodos estatísticos, definição do modelo matemático e do espaço de trabalho, é feito normalmente com auxílio de um *software* que permite todo o processamento dos dados e dos resultados obtidos (Shivhare & Mccreath, 2010). O modelo matemático obtido, através da análise de variância (ANOVA) dos resultados das experiências, vai definir qual(is) o(s) fator(es) e interações entre fatores com maior influência nas respostas. Este modelo é convertido em gráficos que representam os resultados obtidos (Delgado, 2012; Eriksson et al., 2008; Shivhare & Mccreath, 2010). Após a definição do modelo matemático pode ser feita a maximização dos objetivos pré-estabelecidos, que é a principal finalidade do DoE (Silva, 2012).

Após obtenção de um espaço de trabalho, onde o produto/processo possui as características ideais, todas as alterações que forem efetuadas dentro dele não são consideradas uma mudança para a indústria farmacêutica, pois o DoE garante que são seguras no caso de ter sido efetuado corretamente (Shivhare & Mccreath, 2010).

Dentro dos vários *softwares* disponíveis para fazer o desenho de experiências, para este trabalho foi utilizado o JMP (SAS Institute, 2013). Este *software* é muito utilizado em diversas indústrias em todo o mundo, incluindo a indústria farmacêutica, como exemplo é o caso da AstraZeneca, Aventis Pasteur, GlaxoSmithKline, NNE Pharmaplan (SAS Institute, 2013).

O desenho de experiências é uma das ferramentas do *Quality by Design* (QbD), que corresponde ao conceito de desenvolvimento farmacêutico moderno. O conceito de QbD foi introduzido pela Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para o Registo de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH) em conjunto com a FDA através da publicação de três diretrizes - Q8, Q9 e Q10 - que regulam o Desenvolvimento Farmacêutico (2009), a Gestão de Risco (2005) e o Sistema de Qualidade Farmacêutica (2008), respetivamente (Shivhare & Mccreath, 2010).

Segundo a Ordem dos Farmacêuticos (2013) o QbD é “uma abordagem ao desenvolvimento e produção de medicamentos, baseada na ciência e no risco, introduzida nas diretrizes internacionais para a indústria farmacêutica”. O QbD utiliza métodos estatísticos, analíticos e de avaliação de risco para desenhar e desenvolver instalações farmacêuticas e processos de fabrico garantindo a qualidade do produto final. Quando se utiliza o QbD no processo de produção de um produto farmacêutico, obtém-se produtos mais robustos, seguros e eficazes, processos mais robustos e com maior produtividade, reduzindo os riscos do processo e a variabilidade do produto. Também em relação ao

aumento de escala do processo produtivo é necessário menos tempo para o arranque do processo e desde o desenvolvimento até à chegada do produto ao mercado (Branning & Torbeck, 2009).

De forma a coordenar toda a informação de qualidade, segurança e eficácia em relação a um produto foi estabelecido pela ICH o Documento Técnico Comum (CTD) que uniformiza a forma de apresentação de informações acerca de um produto. O CTD está organizado em cinco módulos. O módulo I é específico para cada país e os restantes são comuns para todas as regiões. Em julho de 2003, o CTD tornou-se o formato obrigatório para novas aplicações de medicamentos na União Europeia e no Japão, e um formato altamente recomendável para submissões à FDA (ICH, 2009).

Relativamente às diretrizes estabelecidas pela ICH, a Q8 descreve os conteúdos da secção de Desenvolvimento Farmacêutico (3.2.P.2) do CTD, permitindo a compreensão mais abrangente e o conhecimento dos métodos científicos e da gestão de riscos da qualidade (definida na diretriz Q9) durante o desenvolvimento de um produto e do seu processo de fabricação (ICH, 2009). A aplicação do DoE a este processo facilita a compreensão dos efeitos dos vários parâmetros do processo assim como torna o ambiente mais controlado (Shivhare & McCreath, 2010).

Para se desenvolver um novo produto de acordo com a estratégia QbD tem que ser também definido desde muito cedo o perfil alvo do produto (TPP), que se pretende alcançar e que vai evoluindo ao longo do desenvolvimento do produto. O TPP encontra-se definido na diretriz Q8 e é constituído pela definição das características do produto acabado que permitem alcançar a qualidade desejada para esse produto e um produto eficaz e seguro. O TPP deve descrever o uso, a segurança e a eficácia do produto; nele se reúnem todas as informações acerca das substâncias ativas, potenciais excipientes, operações unitárias do processo; inclui a formulação a reproduzir e o processo de fabrico; identificam-se os parâmetros críticos do processo, e as características das matérias-primas a serem controladas e estabelece-se um espaço de trabalho utilizando o DoE (Estevens, 2010).

A diretriz Q9 fornece informações sobre a gestão de riscos da qualidade. É um documento que serve de complemento às práticas de qualidade existentes na indústria farmacêutica, embora possa ser completada com outros documentos. Fornece indicações sobre os princípios e algumas ferramentas de gestão de riscos de qualidade de forma a serem tomadas opções eficazes e consistentes em relação aos fármacos durante todo o seu ciclo de vida (ICH, 2005).

Na diretriz da ICH sobre o sistema de qualidade, a Q10, são focados o desenvolvimento e fabrico das substâncias ativas assim como dos medicamentos, onde se incluem os medicamentos biotecnológicos e produtos biológicos contemplando todo o ciclo de vida dos produtos, reconhecendo as diferenças entre os objetivos de cada uma das diferentes fases (ICH, 2008).

Objetivos

Os principais objetivos desta tese são o desenvolvimento de uma formulação tópica de anestésicos locais com melhores características que a formulação existente no mercado, recorrendo a uma ferramenta de desenho de experiências para obtenção da formulação ideal. Para tal começou-se por definir o TPP de formulação que contém os objetivos específicos a atingir (Tabela I).

Tabela I: Perfil alvo do produto (TPP) da microemulsão estudada.

Atributo	TPP	Descrição
Área terapêutica	Anestesia	Anestesia de pele intacta
Forma de dosagem	Microemulsão	Microemulsão óleo em água, contendo lidocaína e prilocaína a 2,5% numa proporção de 1:1 (concentração igual à do produto comercial EMLA® - AstraZeneca, 2010b), com uma viscosidade que permita bom espalhamento e extrudabilidade da bisnaga e com pH não abrasivo para a pele.
Via de administração	Aplicação tópica	Aplicação em pele intacta.
Formulação	Microemulsão o/w	As microemulsões apresentam excelente taxa de penetração em camadas profundas do estrato córneo quando comparadas a formulações convencionais e maior estabilidade que as emulsões. Permitem ainda solubilizar fármacos com solubilidades diferentes na mesma formulação. As microemulsões o/w são menos gordurosas que as w/o e por isso é melhor a aceitação por parte do doente.
Método de fabrico	Simple e robusto	Método de preparação simples, fácil de reproduzir à escala industrial e utilizando equipamento comum na indústria farmacêutica.
Excipientes	Excipientes padrão	Excipientes, com vários fornecedores alternativos, aprovados pelas autoridades regulamentares para aplicação na pele e com uma boa relação custo-benefício.
Frequência de aplicação	Tempo de aplicação inferior a 1h	Com EMLA a anestesia dérmica satisfatória é atingida 1 hora após a aplicação chegando a durar 2 a 3 horas após a remoção do creme (APP Pharmaceuticals, 2008). O tempo necessário para se atingir o efeito terapêutico deve ser inferior ao da formulação já comercializada.
Dispositivo de entrega do fármaco	Bisnaga	Bisnaga de 2g com 50mg lidocaína e 50mg prilocaína.
Dose fixa combinada	Anestésicos tópicos (Lidocaína e Prilocaína)	Mistura de 2,5% de lidocaína e 2,5% de prilocaína é indicado para anestesia tópica de pele intacta para obtenção de anestesia local (APP Pharmaceuticals, 2008).
Estabilidade	Estável a temperatura ambiente	Evitar transporte refrigerado e condições especiais de armazenamento.
Segurança	Seguro para produzir anestesia da pele intacta	Aplicação em pele intacta causa anestesia sem pôr em causa a segurança do doente.

Materiais e Métodos

I. Introdução

Após definição do TPP da formulação a desenvolver foi feita uma pesquisa bibliográfica de forma a encontrar microemulsões que preenchessem os requisitos pré-definidos e pudessem servir como ponto de partida para o desenvolvimento da nova formulação. Também foram escolhidas formulações que tivessem um método de preparação simples sem recurso a sistemas ou processos muito complexos de forma a aumentar a probabilidade de poderem ser produzidas à escala industrial e excipientes fáceis de adquirir.

Na Tabela 2 encontram-se as formulações selecionadas (formulação A e B).

Tabela 2: Constituição das formulações base.

	Formulação	A (Rozman et al., 2009)	B (Chen et al., 2006)
Constituintes	Surfatante	Tween 80	Tween 40
	Co-surfatante	Imwitor 308 (Caprilato de Gliceril)	Propilenoglicol
	Fase oleosa	Miristato de Isopropilo	Oleato de Etilo
	Gelificante	Carbómero	Goma Xantana
	Fase aquosa	Água Purificada	Água Purificada

Após a escolha e seleção das formulações a utilizar foram contactados fornecedores de forma a obter os componentes das formulações.

2. Materiais

A lidocaína e a prilocaína foram obtidas da Moehs Catalana, S.L., Barcelona, na forma de cloridrato. O propilenoglicol foi obtido da Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha.

Os restantes excipientes foram gentilmente cedidos por diversos fornecedores, deste modo o oleato de etilo, o miristato de isopropilo, a trietanolamina foram obtidos da Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha; o Tween 40 foi obtido da Croda Europe Limited, Barcelona, Espanha e também da Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha; o Tween 80 foi obtido da Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha; o Imwitor 308 foi cedido pela Oxi-Med Expres, S.A.

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais
Barcelona, Espanha; a goma xantana foi obtida através da Jungbunzlauer AG, Wien, Áustria; o polímero Carbopol 974NF Polymer foi obtido através da Lubrizol Advanced Materials, Waalwijk, Holanda.

3. Métodos

3.1. Preparação das formulações

Inicialmente as formulações (A e B) foram preparadas sem substâncias ativas recorrendo à agitação magnética preparando a formulação num copo de forma alta com auxílio de um magnete e uma placa de agitação (Figura 13 - A). Começou-se por colocar o surfatante no copo, inicia-se a agitação a 750rpm e depois adicionam-se, um a um, os restantes excipientes da formulação, co-surfatante, óleo, água purificada e o gelificante, de acordo com os procedimentos descritos nos artigos onde se encontram descritas (Chen et al., 2006; Rozman et al., 2009) e consoante as proporções descritas na Tabela 3 (três variantes da formulação A com diferentes percentagens de excipientes e uma da formulação B). Este processo de fabrico encontra-se representado no fluxograma da Figura 14.

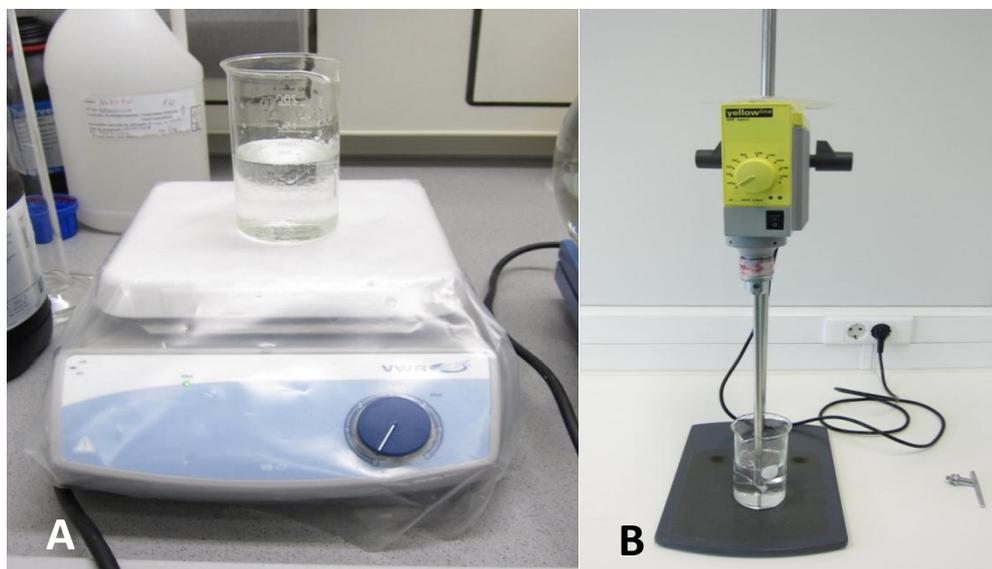


Figura 13: Métodos de preparação das formulações. A: Preparação da formulação por agitação magnética; B: Preparação da mistura com auxílio de agitação mecânica, com o equipamento misturador.

Tabela 3: Composição das formulações inicialmente preparadas.

Componentes (%)	Formulações			
	A			B
	1	2	3	
Surfatante	14,79	14,79	14,42	20
Co-surfatante	14,79	14,79	14,42	10
Fase oleosa	9,86	24,65	24,03	6
Água	60,56	45,77	42,16	60
Gelificante	0	0	2,47	1,5

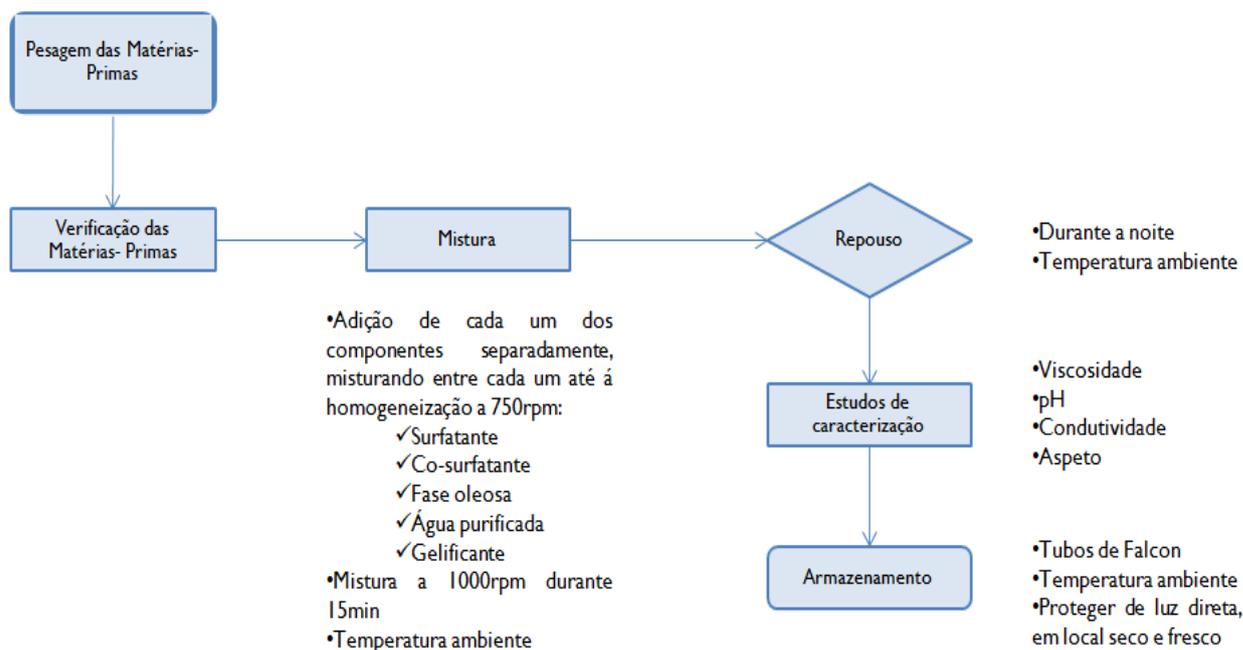


Figura 14: Fluxograma do processo de produção das formulações.

Como indicado no fluxograma (Figura 14) todas as formulações antes de serem analisadas foram deixadas a repousar à temperatura ambiente, tal como descrito em Merclin, Bramer & Edsman (2004) e, finalmente, são armazenadas em tubos de Falcon.

Verificou-se que a preparação por agitação magnética não era suficiente para a preparação de uma formulação homogénea, por isso, como alternativa, utilizou-se a agitação mecânica para a sua preparação, que se verificou conduzir a melhores resultados. Foi para este efeito utilizado o equipamento misturador, Ika Mixer, fazendo a mistura a 750rpm (Figura 13 - B). Após a adição de todos os componentes, a formulação foi misturada por mais 15 minutos a 1000rpm.

3.2. pH

O pH das formulações foi verificado diretamente com um potenciômetro Metrohm Titroprocessor com eletrodo de vidro combinado. Todas as medições foram efetuadas à temperatura ambiente e em triplicado.

3.3. Viscosidade

A viscosidade das formulações foi avaliada recorrendo a um reômetro de tensão controlada Haake, modelo RSI. Todas as medições foram efetuadas com uma taxa de cisalhamento na gama de 0 a 100s^{-1} , testando duas temperaturas diferentes 25°C (valor da temperatura ambiente) e 32°C (temperatura da pele). Para as formulações mais líquidas (menos viscosas) foi utilizado o sistema de cilindro, enquanto que para as mais viscosas, foi avaliada a sua viscosidade com recurso ao sistema prato-prato. Todas as análises foram efetuadas em triplicado.

3.4. Condutividade

A condutividade elétrica das formulações foi determinada recorrendo a um condutivímetro (Figura 15) WTW 330i, a uma temperatura de $25,0^{\circ}\text{C}$, estando o equipamento devidamente calibrado e sendo verificado antes de cada análise. A sonda tem uma constante da célula de $0,100 \pm 0,1\%$. Todas as medições foram efetuadas em triplicado.



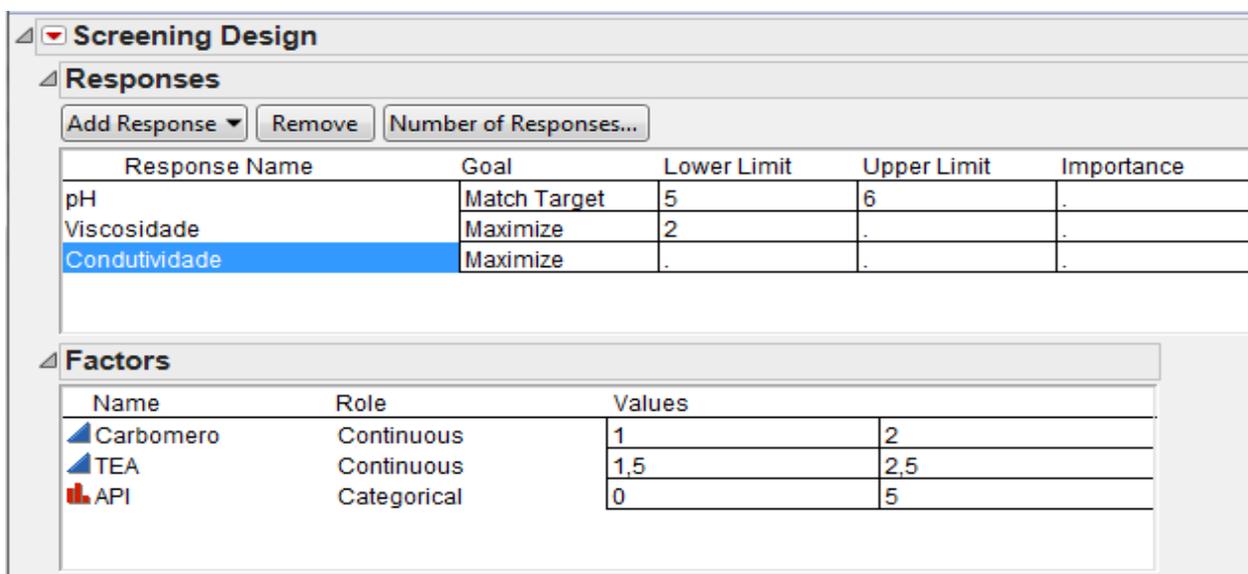
Figura 15: Equipamento de medição de condutividade WTW (UNESP, n.d.).

3.5. DOE

Para o desenvolvimento da formulação foi utilizado o programa de desenho de experiências JMP, SAS Institute.

Assim foram efetuados diversos desenhos de experiências dos quais foram sendo escolhidas as formulações que reuniam os melhores resultados, tendo em conta os fatores analisados. Verificou-se também a robustez do método utilizado para se obter a melhor equação para cada resposta, através da análise dos parâmetros estatísticos R^2 e valor de p .

Foram feitos ao longo do trabalho vários desenhos de experiências para as respostas viscosidade, pH, condutividade e concentração de fármaco libertado. Foram considerados como fatores a percentagem de agente gelificante e TEA e os seus limites foram definidos de acordo com os dados existentes na bibliografia dos fornecedores, artigos científicos e resultados dos estudos de pré-formulação efetuados. A definição correta dos limites dos fatores é determinante para o sucesso dos resultados alcançados e é um passo que depende do investigador. Desta forma, foram selecionados os seguintes intervalos de concentração [1,5 a 2,5%] para a trietanolamina e [1 e 2%] carbómero que foram introduzidos no JMP (Figura 16).



The screenshot shows the 'Screening Design' window in JMP. It is divided into two main sections: 'Responses' and 'Factors'.

Responses Table:

Response Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Importance
pH	Match Target	5	6	.
Viscosidade	Maximize	2	.	.
Condutividade	Maximize	.	.	.

Factors Table:

Name	Role	Values
Carbomero	Continuous	1 2
TEA	Continuous	1,5 2,5
API	Categorical	0 5

Figura 16: Funcionamento do programa de DoE, JMP – inserção dos fatores e dos seus limites e respostas que vão ser avaliadas e respetivos objetivos.

O *software* permite escolher o tipo de desenho fatorial que se pretende (completo - *full* ou fracionado - *fractional*), se é pretendida ou não a divisão em blocos (cada bloco corresponde a um dia diferente) e ainda a presença ou não de pontos centrais e de replicados (Figura 17). Neste trabalho optou-se por um desenho fatorial completo, com a

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais
 divisão das experiências por dois dias diferentes. As experiências foram divididas em 2 blocos que correspondem a dois dias diferentes de preparação por não ser possível realizar todas as experiências num só dia, o que permite ao *software* ter em conta a variabilidade dos resultados devido ao facto de terem sido obtidos em dias diferentes.

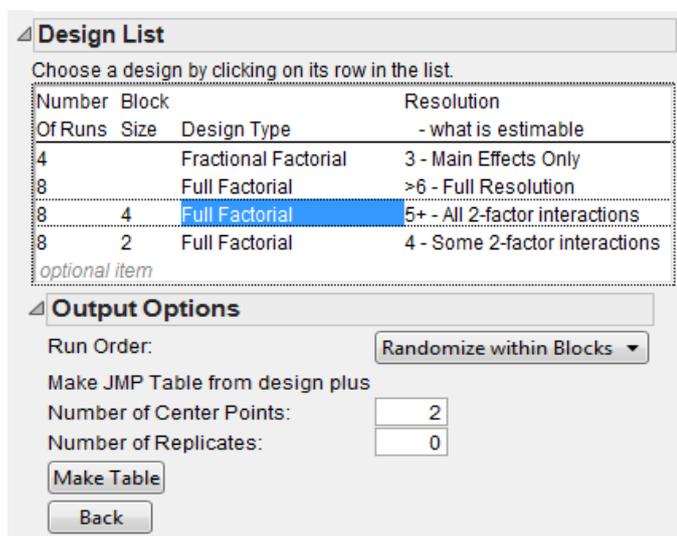


Figura 17: Funcionamento do programa de DoE – escolha do tipo de desenho fatorial.

Após esta seleção o *software* faz uma conjugação dos valores que lhe são fornecidos e devolve uma tabela com os ensaios a realizar pela ordem que devem ser efetuados (Figura 18).

Pattern	Block	Carbomero	TEA	API	pH	Viscosidade	Condutividade
1 +++	1	2	1,5	5		•	•
2 001	1	1,5	2	0		•	•
3 ++-	1	2	2,5	0		•	•
4 ---	1	1	2,5	5		•	•
5 ---	1	1	1,5	0		•	•
6 --+	2	1	1,5	5		•	•
7 +-+	2	2	1,5	0		•	•
8 002	2	1,5	2	5		•	•
9 +-+	2	1	2,5	0		•	•
10 +++	2	2	2,5	5		•	•

Figura 18: Funcionamento do programa de DoE – Tabela com as experiências a realizar.

Os valores das respostas a alcançar foram definidos de acordo com o TPP definido inicialmente, pesquisa bibliográfica e resultados obtidos nos estudos de pré-formulação.

Após obtenção da equação do modelo desenhado para cada uma das respostas são fornecidos pelo *software* os valores previstos segundo esse modelo para cada uma das experiências realizadas e de seguida são desenhados gráficos de perfil onde podem ser obtidos valores previstos para respostas ou fatores (ex: se é pretendida uma formulação com viscosidade 2Pa.s e pH 5 o gráfico devolve as % de carbómero e TEA a colocar na formulação e vice-versa) e ainda gráficos de contorno e de superfície através dos quais se pode encontrar e definir a zona de trabalho para cada formulação que permite obter as formulações com todas as características avaliadas dentro dos valores desejados.

3.6. Estudos de libertação

Os estudos de libertação dos fármacos da formulação utilizando um sistema de difusão vertical foram efetuados com base nas indicações da USP (USP, 2009a). Foram utilizadas células de difusão vertical do tipo Franz num sistema composto por 6 células (Figura 19) acoplado a um banho termostaticado.

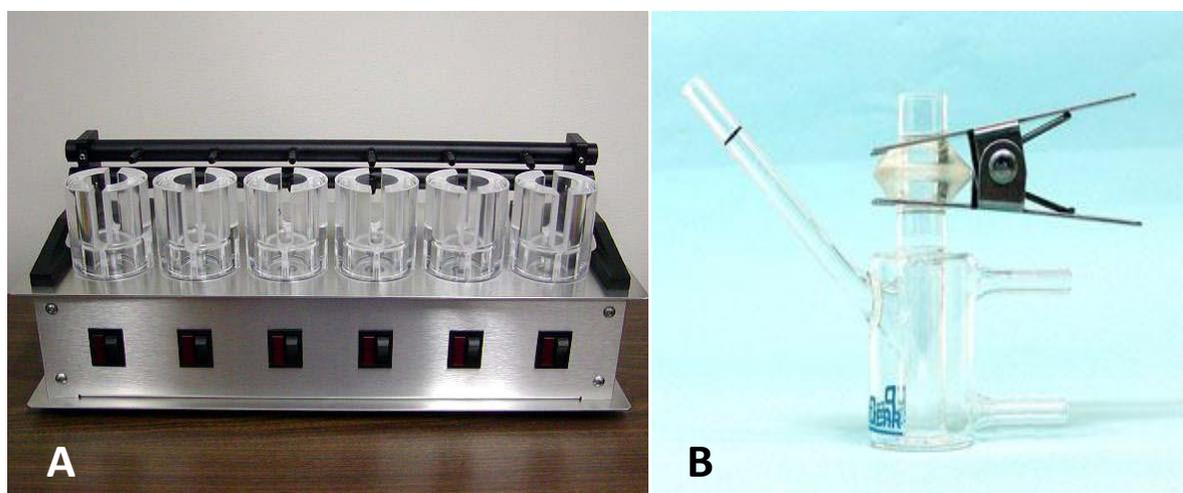


Figura 19: Equipamento PermeGear para 6 células de difusão vertical do tipo Franz. A: suporte das células com sistema de agitação; B: Célula de Franz (PermeGear, 2005).

A solução tampão escolhida para os estudos de libertação foi o tampão fosfato pH 7,2 composto por hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) com uma concentração de 3,79g/L. O pH 7,2 foi atingido com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) com a concentração de 5N. Foi determinada a solubilidade dos dois APIs neste meio à temperatura

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais

ambiente, de forma a assegurar o cumprimento das *sink conditions* durante todo o ensaio, de acordo com as indicações da Farmacopeia Europeia 7.0 (Quality of Medicines, 2010).

O sistema de difusão PermeGear foi montado e o banho termostaticado que foi acoplado ao sistema foi mantido a 37°C garantindo que a temperatura da solução tampão ronde os 32°C que é a temperatura normal da pele humana. Os compartimentos recetores das células de Franz (V~12mL) foram preenchidos com solução tampão, degaseificada e sonicada durante 30 minutos a 40°C de forma a evitar a formação de bolhas de ar durante o ensaio pois estas podem interferir com os resultados. Cada uma das células possui um sistema de agitação que assegura a homogeneidade do meio de dissolução durante todo o teste.

Foram escolhidas, para colocar no sistema de difusão, membranas de Nylon 80µm da Millipore, que cumprem os requisitos, em termos de porosidade, das diretrizes de estudos de libertação *in vitro* (FDA, 1997) em termos de porosidade, de forma a não se tornarem uma barreira à permeação nem constituírem uma fonte de retenção da substância ativa. As membranas são colocadas na solução tampão antes de serem aplicadas nas células de Franz, para remoção de eventuais contaminantes. Após 30 minutos de equilíbrio são colocadas nas células as membranas, seguidas da anilha e postas as tampas seguras por anilhas, garantindo que não fiquem bolhas de ar retidas por baixo da membrana e que o compartimento recetor está bem cheio.

Foram colocadas entre 200-400mg de cada amostra no compartimento dador das células de Franz. O tubo coletor das células de Franz, assim como o compartimento dador, foram tapados com película protetora de forma a acautelar que não há evaporação do meio nem alteração na formulação devido a evaporação durante o ensaio.

O tempo da análise recomendado pela USP é de 6 a 7h (USP, 2009a), mas após testes preliminares percebeu-se que a libertação de ambos os fármacos era rápida pelo que não havia necessidade de estender o teste para além das 3h. Foram recolhidas alíquotas de solução tampão de 500µL para análise aos 15 e aos 30 minutos e após isso a cada 30 minutos.

Durante cada amostragem e na reposição subsequente de solução tampão fresca deve ser garantido que não entram bolhas de ar que se alojarão por baixo da membrana reduzindo a área de libertação das substâncias ativas. A recolha de amostras foi efetuada ao tempo definido, com uma tolerância de 2 minutos.

A análise das amostras recolhidas, foi feita por HPLC, recorrendo a um método validado para as formulações em estudo, baseado no método da USP de análise do creme

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais
EMLA, comparando as áreas obtidas contra um padrão de referência de 0,04 mg/ml de concentração.

Os cálculos da concentração de fármaco libertado a cada tempo de recolha foram efetuados tendo em conta o volume de cada célula e também o tamanho do seu orifício, assim como o facto de haver diluição há medida que se faz cada recolha de amostra.

As análises foram efetuadas em triplicado.

3.7. Microscopia

Foi feita a análise microscópica das substâncias ativas (lidocaína HCl e prilocaína HCl) de forma a verificar a sua estrutura cristalina. Esta análise foi efetuada num microscópio Zeiss Axioskop, Modelo EL – Einsatz, utilizando ampliações de 100x a 1000x. As formulações preparadas foram também analisadas por microscopia.

Resultados e Discussão

I. Estudos de pré-formulação

Este trabalho foi iniciado com estudos de pré-formulação que permitiram:

- a) definir a composição base das formulações a desenvolver com base em resultados preliminares de viscosidade, pH e de estabilidade;
- b) decidir qual o melhor método de preparação das formulações;
- c) recolher informação e gerar conhecimento necessário para um bom desenho de experiências tais como intervalos de concentrações de determinados componentes das formulações e intervalos de valores das respostas selecionadas que permitem obter as formulações com todas as características desejadas.

O ponto de partida foram as quatro formulações descritas na Tabela 3.

Formulação A

Para a formulação A foram preparadas as três variações com composição relativa de excipientes e com adição ou não de agente gelificante (Tabela 3). O aspeto das três variantes da formulação A é diferente como se pode comprovar pela observação da Figura 20.

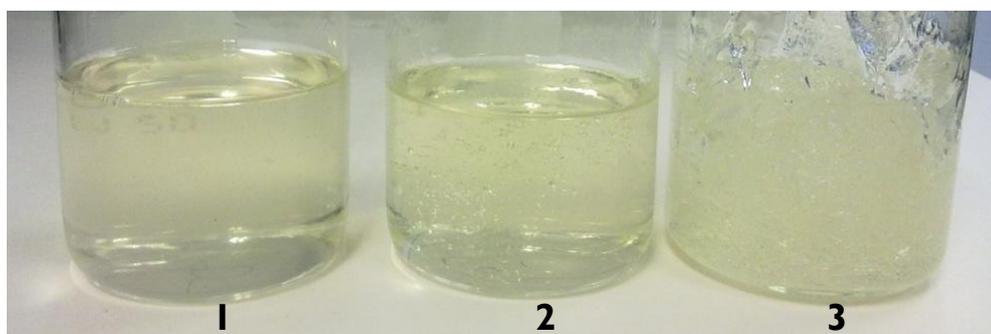


Figura 20: Formulação A (placebo) preparada com o método de agitação magnética e com diferentes proporções dos seus constituintes (Tabela 3).

Durante os estudos iniciais de preparação desta formulação verificou-se que o método de agitação magnética não era suficiente para preparar uma formulação homogénea da variante 3 devido à sua elevada viscosidade (Figura 20 – 3), por isso o método de preparação foi alterado para todas as formulações para um sistema com agitação mecânica com o misturador Ika Mixer (Figura 13 – A). Como se pode verificar pela observação da Figura 21, o aspeto da mesma formulação com diferentes formas de agitação (magnética e

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais mecânica) é bastante diferente. A agitação mecânica permite preparar formulações muito mais homogêneas.

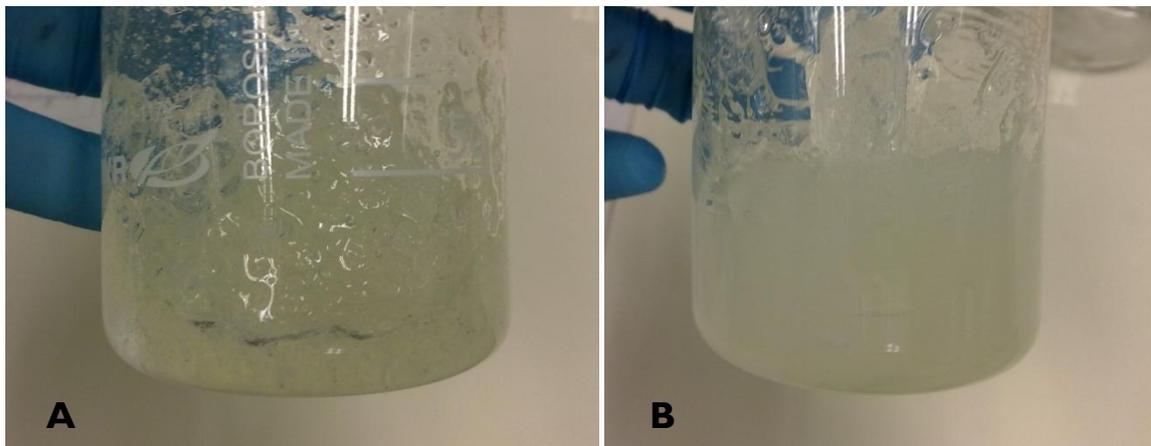


Figura 21: Formulação A preparada com dois métodos diferentes. A: Agitação magnética; B: Agitação mecânica.

Segundo Rozman et al. (2009) todas estas formulações são microemulsões o/w sensíveis à temperatura, a variante 3 é diferente pois tem adição de carbómero. A formulação A1 apresenta muito baixa viscosidade (Tabela 4) (Anexo I – Gráfico 1 e 2) e demonstra alterações da viscosidade com a variação da temperatura entre 25 e 32°C. Os valores de viscosidade obtidos para esta formulação, bem como o seu comportamento com a temperatura, são semelhantes aos reportados por Rozman et al. (2009).

Tabela 4: Variação da viscosidade com a temperatura de análise para as variantes da formulação A.

Formulação	Viscosidade (Pa.s)	
	a 25°C ($\bar{x} \pm \sigma$)	a 32°C ($\bar{x} \pm \sigma$)
A1	0,0274±0,0001	0,0217±0,0002
A2	0,7667±0,0058	0,0353±0,0003
A3	6,0433±0,2155	5,8633±0,2369

A formulação A2, uma microemulsão do tipo o/w apresenta uma baixa viscosidade quando comparada com a formulação A3, mas que é superior à viscosidade determinada para a formulação A1 (Tabela 4). Verifica-se uma diminuição mais acentuada da viscosidade da formulação A2 entre os 25 e os 32°C do que para a formulação A1. Os resultados obtidos para a formulação A2 não são muito concordantes com os resultados obtidos por Rozman et al. (2009) que indicam resultados de viscosidade bastante inferiores aos determinados a 25°C. Apesar disso a formulação A2 tem um aspeto muito líquido, pelo que se torna muito difícil a sua aplicação,

Como era de esperar pela adição de carbómero (agente gelificante), a formulação A3 é a que apresentou valores de viscosidade superiores e muito próximas do aceitável para poder haver um bom espalhamento da formulação durante a aplicação (Tabela 4) (Anexo I – Gráfico 3 e 4). Embora a diferença na temperatura de análise altere a viscosidade desta formulação, a diferença não é significativa. Mais uma vez as viscosidades determinadas para a formulação A3 são diferentes das reportadas por Rozman et al. (2009). As diferenças entre os resultados de viscosidade obtidos e os reportados no artigo podem dever-se ao método de preparação não ser exatamente igual, os excipientes puderem ter características ligeiramente diferentes porque são de fornecedores diferentes e o método de determinação da viscosidade não ser o mesmo nos dois casos.

Os resultados de viscosidade apresentados para todas as experiências efetuadas foram obtidos com base em análises reológicas. Obtiveram-se os resultados da variação da tensão de cisalhamento com a alteração da taxa de cisalhamento e também os resultados de viscosidade.

Apresentam-se de seguida os gráficos através dos quais foram obtidos os valores de viscosidade tanto para a formulação A como para a B.

Pela análise dos gráficos da Figura 22, um exemplo de cada tipo de comportamento, consegue-se perceber a diferença entre uma formulação com comportamento newtoniano (azul) e não newtoniano (verde). Uma formulação com comportamento newtoniano varia de forma constante a tensão de cisalhamento (τ) com a variação da taxa de cisalhamento (γ), enquanto que para um fluido não-newtoniano esta variação não é constante pelo que não se originam retas como no caso anterior mas sim curvas.

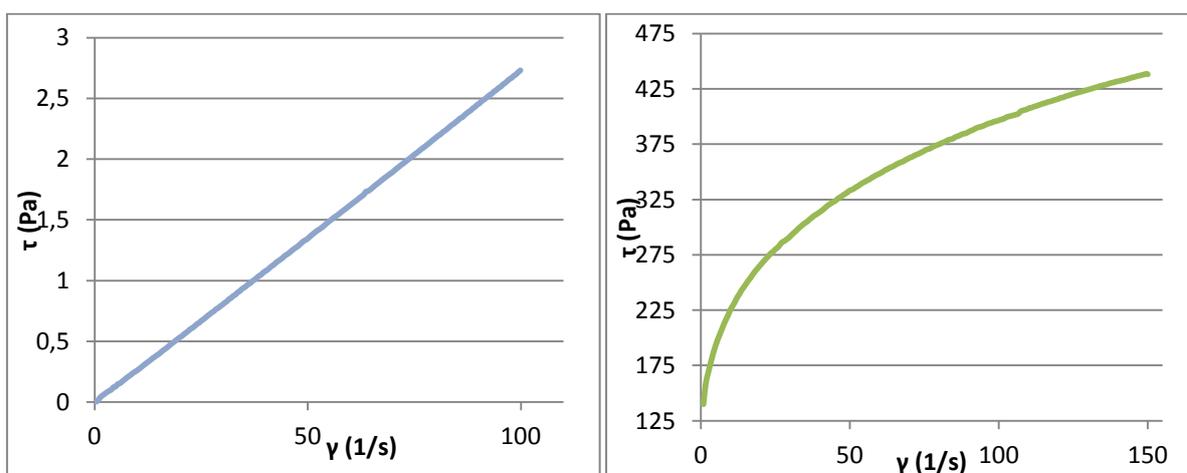


Figura 22: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ).

As formulações com comportamentos newtonianos apresentam viscosidades mais baixas, enquanto que as não-newtonianas são mais viscosas.

Na Figura 23 encontra-se um gráfico da variação da viscosidade (η) em função da taxa de corte (γ) para ajudar a explicar o modo como se obtiveram os valores de viscosidade para cada uma das formulações. As formulações foram analisadas com taxas de cisalhamento dos 0 aos 150s⁻¹. Inicialmente, quando começa a ser aplicada a força, as formulações sofrem grandes alterações na sua viscosidade até aos 20s⁻¹ após o qual estabilizam. O valor concreto de viscosidade para todas as formulações foi retirado aos 100s⁻¹, altura em que as formulações estabilizaram o seu comportamento e ainda não estão no máximo de taxa de corte aplicada. Os três exemplos apresentados na Figura 23 correspondem a uma formulação com viscosidade baixa (azul), intermédia (vermelho) e alta (verde). Podem se fazer corresponder com os gráficos da Figura 22, sendo que à reta azul corresponde a uma formulação com baixa viscosidade e a verde a uma viscosidade alta.

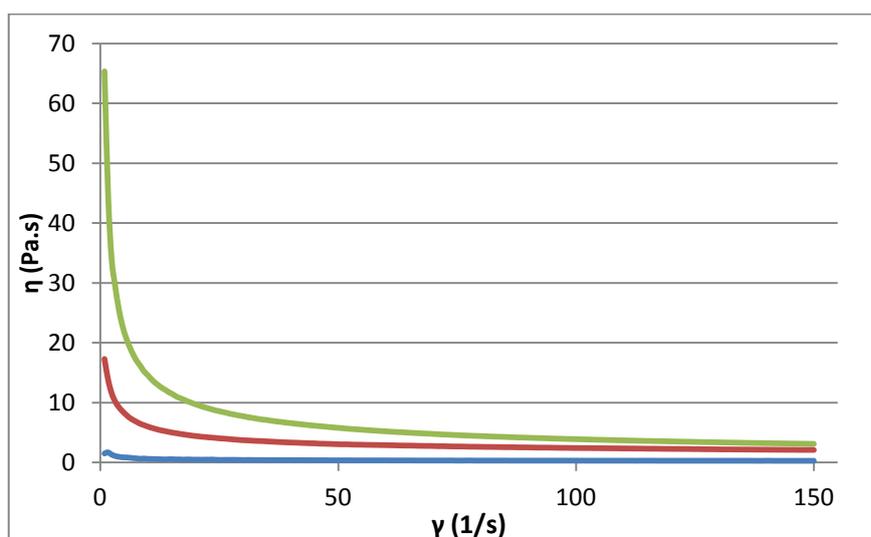


Figura 23: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ).

Ao contrário da formulação A1 e A2 que são bastante mais fluidas e apresentam um comportamento newtoniano, a formulação A3 apresenta um comportamento não-newtoniano variando a tensão de cisalhamento quando variada a taxa de cisalhamento. Em termos de aspeto a formulação A3 apresenta-se transparente e com boas propriedades de espalhamento. Todas elas possuem ainda um odor bastante agradável a coco, devido ao excipiente Imwitor 308.

Como a viscosidade obtida pela adição de carbómero foi um pouco mais elevada do que o desejável, começou-se por reduzir a quantidade de carbómero de 2,5% para 2%. A formulação resultante apresentou uma viscosidade de 3,53Pa.s, a 25°C (Tabela 5) e

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais
 $3,27 \pm 0,02 \text{ Pa.s}$ a 32°C (Anexo I – Gráfico 5 e 6). Ambas as análises reológicas a diferentes temperaturas oferecem valores de viscosidade próximos do alvo de viscosidade, 3 Pa.s . A formulação A3 com redução da % de carbómero garante valores de viscosidade que permitem uma boa espalhabilidade na pele.

A formulação A3 com menos carbómero (2%) foi colocada em câmaras de temperatura (5°C e 25°C) e humidade controladas e foi testada a sua estabilidade (pH e viscosidade) durante 3 meses (Tabela 5) (Anexo I – Gráfico 5, 6, 7 e 8).

Tabela 5: Valores de viscosidade para a formulação A3 com 2% de carbómero analisada a diferentes temperaturas de armazenamento e durante 3 meses.

Tempo de armazen. (meses)	Temp. de armazen. (°C)	Viscosidade (Pa.s), a 25°C ($\bar{x} \pm \sigma$)
0	25	$3,53 \pm 0,1300$
0	5	$3,52 \pm 0,6255$
2	25	$3,56 \pm 0,1767$
2	5	$3,65 \pm 0,1473$
3	25	$4,32 \pm 0,7623$
3	5	$3,76 \pm 0,1916$

Verificou-se que a viscosidade da formulação aumenta ligeiramente com o tempo nas duas temperaturas de armazenamento. No entanto, os valores de viscosidade mantêm-se adequados para assegurar um bom espalhamento da formulação na pele e não se verificaram alterações da cor ou odor durante o armazenamento.

A variação do pH da formulação A3 com 2% de carbómero foi também analisada ao longo de 3 meses em duas temperaturas de armazenamento (5 e 25°C). O pH da formulação é de $3,51$ a $T=0\text{M}$, sofrendo variações pouco significativas ao longo do tempo de armazenamento nas duas temperaturas (Tabela 6). O fator mais preocupante foi o valor de pH abaixo do pH normal da pele ($5-6$) e que por isso poderia causar irritação quando aplicada na pele.

Tabela 6: Resultados de pH para a formulação A3 com 2% de carbómero.

Condição	pH
T=0M 25°C	3,51
T=2M 2°C	3,44
T=2M 5°C	3,44
T=3M 25°C	3,52
T=3M 5°C	3,48

Ainda que a viscosidade da formulação A tenha sido significativamente melhorada com a adição de carbómero à formulação, verificou-se que o pH passa de valores próximos do pH da pele (5,05 – A1 e 5,08 – A2), para valores muito baixos (A3: 3,43 com 2,5% carbómero; 3,51 com 2% carbómero). Depois dos estudos com a formulação placebo, foram adicionados às formulações as duas substâncias ativas (em separado) na concentração de 2,5% cada, que é a mesma concentração da formulação comercial, para avaliar o efeito das substâncias ativas na formulação. Como a lidocaína e a prilocaína se apresentam na forma de cloridrato, o pH da formulação baixou ainda mais de 3,25 (formulação placebo) para 2,76 com 2,5% de lidocaína HCl e para 2,77 com 2,5% de prilocaína HCl. Verificou-se também que a viscosidade também diminuiu drasticamente (0,98Pa.s, a 25°C – lidocaína HCl e 0,70Pa.s, a 25°C – prilocaína HCl), pois a redução do pH altera a capacidade de gelificação do carbómero, isto é, a baixo pH as cadeias do polímero encontram-se menos ionizadas e a pH mais elevado ficam mais ionizadas. As cargas negativas dos grupos carboxílicos ionizados do carbómero são responsáveis pela gelificação da formulação ao promoverem a repulsão entre as cadeias de polímero. Por este motivo a capacidade gelificante do carbómero aumenta com o aumento do pH (Kermany, 2010).

Para atingir o máximo efeito de espessamento das moléculas de carbómero, ou seja viscosidades mais elevadas, estas devem ser totalmente desenroladas e o modo mais comum de o fazer é converter as moléculas ácidas num sal, por adição de um agente neutralizante apropriado, tal como a trietanolamina (TEA). A neutralização ioniza as moléculas de carbómero, gerando cargas negativas ao longo da espinha dorsal do polímero, e a repulsão eletrostática resultante cria uma estrutura tridimensional estendida (Walters, 2002).

O carbómero utilizado na composição das formulações estudadas é o Carbopol® 974 NF Polymer, da Lubrizol. Este polímero foi introduzido inicialmente em formulações de uso oral, sendo comprovado o seu efeito espessante e estabilizador quando incorporado em sistemas para aplicação tópica com elevada viscosidade (Lubrizol, 2011). Segundo a Lubrizol existem vários agentes neutralizantes passíveis de utilização na neutralização de géis, é o caso da trietanolamina, do hidróxido de potássio ou de sódio a 20%. A TEA deve ser utilizada numa proporção de 1,5:1,0 com o carbómero (Lubrizol, 1998).

Tentou então solucionar o problema do baixo pH da formulação com a adição de TEA que é uma amina terciária, utilizada como um agente alcalinizante e muito utilizada na indústria farmacêutica e de cosméticos, assim como em outras indústrias, para obter resultados desejados de pH (Rowe, Sheskey & Quinn, 2009). O aumento do pH da formulação consegue resolver dois problemas, o problema de ter uma formulação com um

pH irritante para a pele e o problema da gelificação do carbómero cuja capacidade gelificante é ideal com valores de pH próximos de 7 conseguindo-se valores de viscosidade bastante melhores com uma quantidade muito mais reduzida de carbómero.

A condutividade das formulações foi também avaliada para verificar se esta medida permitiria distinguir entre microemulsões com diferentes proporções de fase oleosa e fase aquosa. Verificou-se que os valores de condutividade determinados para as diversas formulações são muito diferentes. A formulação A1 apresenta valores de 42,3 μ S/cm, e a A2 de 9,42 μ S/cm, o que demonstra que o aumento da fase óleo e consequente diminuição da quantidade de água faz com que a condutividade diminua, ou seja, valores mais altos de condutividade estão associados a formulações com uma maior proporção de fase aquosa quando a composição das formulações não varia significativamente. A formulação A3 apresenta valores de condutividade de 72,4 μ S/cm, com 2,5% de carbómero e 96,4 μ S/cm com apenas 2%, este aumento na condutividade comparado com as outras formulações A1 e A2 pode dever-se ao carácter iónico do carbómero que poderá alterar as propriedades condutoras da formulação. Estas conclusões são retiradas quando se analisam apenas os resultados relativos às formulações placebo.

Após a preparação das três variantes da formulação A e a sua caracterização verificou-se que apenas a formulação com carbómero (A3) permite assegurar uma viscosidade adequada para uma boa aplicação tópica e que demonstrava ser relativamente estável nos estudos de pré-estabilidade (considerando que não se encontrava armazenada na embalagem primaria final). Por estes motivos a formulação A com carbómero foi escolhida para prosseguir o desenvolvimento recorrendo ao DoE.

Formulação B

A formulação B foi igualmente preparada numa fase inicial sem a adição de nenhum fármaco, com os constituintes descritos na Tabela 3 e com o método de agitação mecânica. Esta formulação foi igualmente caracterizada com as técnicas descritas para a formulação A.

O aspeto desta formulação é bastante diferente do da A3 (Figura 24), devido à diferente composição, apresenta mais opacidade e a olho nu parece ter maior plasticidade porque se verifica a formação de fios quando se retira uma amostra (García-Ochoa et al., 2000) que pode indicar a presença de um sistema mais próximo do bicontínuo do que uma microemulsão o/w (Zachar, 2010).

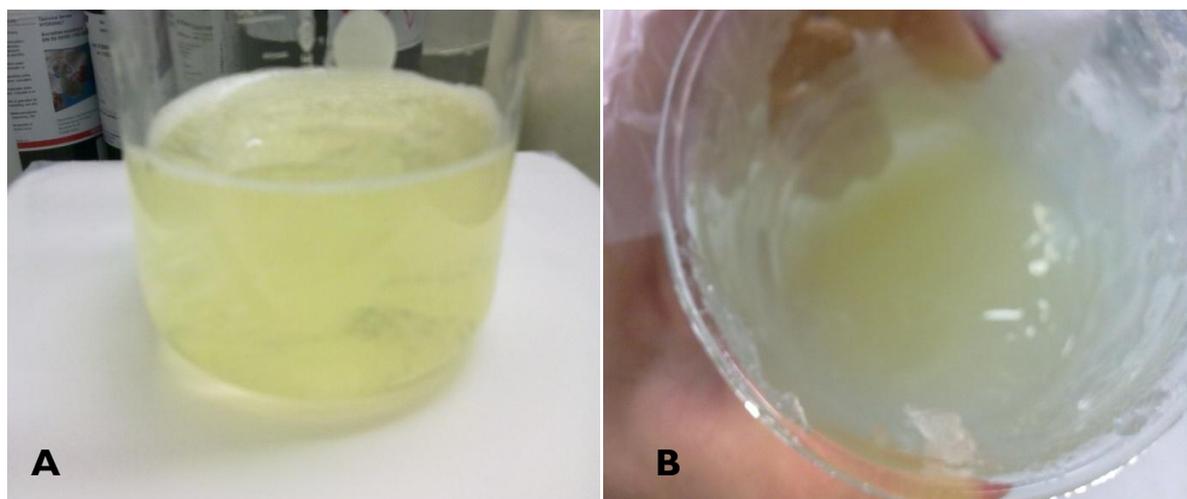


Figura 24: Preparação da formulação B antes (A) e depois (B) da adição de goma xantana.

O odor é um pouco mais desagradável, pois nenhum excipiente lhe confere um cheiro agradável, como é o caso do Imwitor 308 presente na formulação A. No entanto, este problema pode ser ultrapassado com a adição de um aroma no futuro. Esta formulação parece também ser também promissora do ponto de vista organoléptico e de viscosidade.

Verificou-se que o pH desta formulação é mais elevado que os valores de pH medidos nas três variações da formulação A, apresentando valores próximos de 6,61 (Tabela 7). Tal como foi feito para a formulação A também foi realizado um estudo de pré-estabilidade para a formulação B. Verificou-se ao longo dos 3 meses de armazenamento se nota uma descida dos valores de pH apesar de não serem muito significativos (Tabela 7).

Tabela 7: Variação do pH da formulação B com armazenamento a 25°C durante 3 meses.

Condição	pH
T=0M 25°C	6,61
T=2M 25°C	6,55
T=3M 25°C	6,31

Em relação aos valores de viscosidade determinados estes são bastante diferentes da formulação A, também porque o seu gelificante é diferente, sendo neste caso a goma xantana. Assim os valores são de $0,703 \pm 0,0058 \text{ Pa.s}$ a 25°C e $0,690 \pm 0,0520 \text{ Pa.s}$ a 32°C (Anexo I – Gráfico 9 e 10), mostrando que diferentes temperaturas de análise têm pouca influência na viscosidade da formulação. A formulação B apresenta, do mesmo modo que a A, um comportamento não-newtoniano, ou seja, modifica, embora de forma diferente, o seu comportamento com diferentes tensões de cisalhamento. Apesar dos valores de viscosidade determinados serem mais próximos da formulação A2, o seu aspeto é mais sólido e o seu espalhamento na pele é mais fácil e adequado.

Após 3 meses de armazenamento a 25°C denota-se um aumento da viscosidade, para $0,950 \pm 0,1217 \text{ Pa.s}$, a 25°C; a 5°C a viscosidade mantém-se próxima dos valores iniciais a $0,747 \pm 0,0252 \text{ Pa.s}$, a 25°C (Anexo I – Gráfico 11 e 12). Adicionalmente verifica-se uma deterioração das propriedades organolépticas ao longo do armazenamento a 25°C, o que parece indicar alguma degradação da formulação e mesmo uma possível contaminação.

A alteração da viscosidade ao longo do armazenamento a 25°C assim como a aparente alteração da formulação a olho nu poderiam implicar que no futuro a formulação teria de ser sempre conservada no frigorífico de modo a manter a sua qualidade, o que acarretaria custos mais elevados do que conservação a temperatura ambiente e maiores inconvenientes para os doentes. Estes resultados podem-se dever à presença da goma xantana pois, assim como num estudo descrito por García-Ochoa et al. (2000), se indicam que as soluções com goma xantana, quando conservadas a temperatura ambiente, aumentam a sua viscosidade o que pode acarretar problemas futuros com extrudabilidade da bisnaga e dificuldades de espalhamento por ser demasiado viscosa.

Estes resultados de pré-estabilidade indicaram que as formulações com goma xantana são menos estáveis que a formulação A com carbómero. De forma a ser ultrapassado este problema de estabilidade eventualmente derivado da goma xantana, e como de resto esta formulação aparentava ser promissora em termos de propriedades organolépticas e de espalhamento decidiu-se substituir a goma xantana pelo Carbopol 974NF *Polymer* (gelificante da formulação A) e prosseguir-se com o desenvolvimento da formulação recorrendo ao DoE. Como tal, também houve necessidade de adicionar a esta formulação TEA e para chegar à quantidade ideal recorreu-se ao DoE para testar qual a melhor proporção de TEA : carbómero que garantisse uma viscosidade adequada, pH e % de libertação de fármaco ideal, para corresponder às características alvo do TPP.

A condutividade foi também avaliada e verificou-se que esta formulação apresenta um valor de $389 \mu\text{S/cm}$, valores mais elevados do que os da formulação A, apesar de estes não puderem ser comparados diretamente devido à diferente composição das formulações.

Os estudos de pré-formulação para a formulação A e B serviram para conseguir reduzir o número de formulações de 4 para 2, avançando apenas com aquelas que demonstraram as características mais adequadas. Permitiram ainda selecionar o agente gelificante mais adequado e estável e o método de preparação mais adequado à composição, viscosidade e tipo de formulações preparadas (microemulsões). Verificou-se ainda que as substâncias ativas alteravam o pH e a viscosidade das formulações com carbómero de forma muito significativa pelo que se teria de incorporar um agente neutralizante que corrigisse

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais

este problema, nos estudos futuros. Desta forma continuaram-se os estudos de forma a avaliar qual a melhor proporção de TEA e carbómero para a formulação A e B de forma a obter formulações com as características ideais. Foi também estudada a influência da adição das substâncias ativas nas respostas estudadas (pH, viscosidade e condutividade) quando adicionadas às formulações com carbómero recorrendo ao DoE.

2. Desenvolvimento da formulação

1º Estudo - Avaliação da influência dos fatores nas características das formulações

Após uma primeira seleção de duas formulações promissoras para atingir os objetivos (formulação A e B com carbómero) começou por fazer-se um primeiro desenho de experiências para:

a) avaliar a influência da concentração de carbómero, de TEA e das substâncias ativas (fatores) na viscosidade, pH e condutividade (respostas) das duas formulações;

b) determinar a quantidade de carbómero e de TEA que assegurem as respostas dentro dos valores definidos como desejáveis para as duas formulações.

Neste desenho de experiências estabeleceram-se como limites 1 a 2% de carbómero, 1,5 a 2,5% de trietanolamina considerando a experiência dos estudos de pré-formulação e por informações recolhidas junto de fornecedores e em artigos científicos. A quantidade de substância ativa foi mantida constante (2,5% de cada um dos anestésicos, num total de 5%) pois aqui o objetivo foi apenas estudar a sua influência nas respostas e porque esta era a concentração que se pretendia ter na formulação final. O *software* forneceu a lista de experiências a executar e foram assim preparadas 10 formulações diferentes com a composição indicada nas Tabelas 8 e 9 e foram determinados os valores de pH, condutividade e viscosidade em triplicado (nas tabelas encontram-se os valores médios determinados e os respetivos desvios padrão).

Com estes resultados de pH, condutividade e viscosidade foi feita a análise estatística com o programa JMP, através do qual se obteve uma equação de resposta que descreve o modo como cada um dos fatores influencia cada uma das respostas. Esta equação pode ser mais ou menos robusta de acordo com os parâmetros estatísticos (R^2 e p) que a caracterizam, assim quanto mais próximo de 1 for o R^2 melhor o modelo obtido se vai ajustar à amostra estudada; o valor de p , isto é, a probabilidade dos resultados serem estatisticamente significativos e terem o mínimo de variância dentro da amostra, resulta da análise de variância (ANOVA), convém que seja menor que 0,05 e o mais baixo possível, ou seja, assim o modelo tem 95% de probabilidade de estar correto.

As equações obtidas, para cada uma das respostas, permitem calcular os valores previstos por esse modelo matemático para cada uma das formulações preparadas e esses valores foram também incluídos nas Tabelas 8 e 9. Estes valores são os que permitem fazer o desenho de todos os gráficos que são apresentados de seguida.

Tabela 8: Resultados das experiências do DoE para a formulação A.

N°	Bloco	Fatores			Respostas obtidas			Respostas previstas		
		API (%)	Carbómero (%)	TEA (%)	pH ($\bar{x} \pm \sigma$)	Condut. ($\mu\text{S/cm}$) ($\bar{x} \pm \sigma$)	Viscosidade (Pa.s) ($\bar{x} \pm \sigma$)	pH	Condut. ($\mu\text{S/cm}$)	Viscosidade (Pa.s)
1	2	5	1	2.5	6.37±0,064	2463±49,33	0.27±0,017	6,50	2495	0,77
2	1	0	1.5	2	6.45±0,061	238±6,43	1.08±0,219	6,54	233	1,67
3	1	0	1	1.5	6.77±0,049	239±5,51	1.18±0,145	6,93	272	0,77
4	1	0	2	2	6.19±0,012	211±5,20	0.72±0,038	6,93	272	0,77
5	2	5	2	1.5	4.95±0,045	2533±46,19	1.90±0,171	4,89	2573	2,58
6	1	0	1	2.5	8.02±0,023	219±5,57	0.17±0,006	7,78	194	0,77
7	2	5	1	1.5	5.76±0,032	2640±20,00	1.21±0,067	5,65	2573	0,77
8	2	5	2	2.5	5.65±0,021	2467±30,55	4.04±0,339	5,74	2495	2,58
9	1	0	2	1.5	5.35±0,017	257±2,08	3.41±0,219	5,30	272	2,58
10	2	5	1.5	2	5.74±0,052	2567±32,15	2.73±0,248	5,69	2534	1,67

Tabela 9: Resultados das experiências do DoE para a formulação B.

N°	Bloco	Fatores			Respostas obtidas			Respostas previstas		
		API (%)	Carbómero (%)	TEA (%)	pH ($\bar{x} \pm \sigma$)	Condut. ($\mu\text{S/cm}$) ($\bar{x} \pm \sigma$)	Viscosidade (Pa.s) ($\bar{x} \pm \sigma$)	pH	Condut. ($\mu\text{S/cm}$)	Viscosidade (Pa.s)
1	1	5	1	2.5	6.73±0,049	3563±77,67	1.10±0,032	6,81	3708	0,89
2	1	0	1.5	2	6.61±0,035	804±25,36	8.41±0,908	6,60	766	8,36
3	1	0	1	1.5	6.91±0,021	614±34,04	6.79±0,300	7,01	701	6,74
4	1	0	2	2	5.84±0,010	892±39,84	10.07±0,142	5,80	830	9,98
5	1	5	2	1.5	5.21±0,010	3517±81,45	0.94±0,015	5,17	3578	2,33
6	2	0	1	2.5	7.91±0,064	718±4,93	6.67±0,207	7,82	701	6,74
7	2	5	1	1.5	6.07±0,010	3783±40,41	0.60±0,035	6,00	3708	0,89
8	2	5	2	2.5	5.93±0,010	3670±65,57	3.63±0,260	5,98	3578	2,33
9	2	0	2	1.5	5.35±0,025	800±43,75	9.87±0,320	5,39	830	9,98
10	2	5	1.5	2	6.01±0,012	3683±120,97	1.77±0,229	5,99	3643	1,61

Formulação A

Na formulação A, quando são adicionados os dois APIs à formulação verifica-se que os valores de condutividade aumentam drasticamente para valores próximos de 2500 μ S/cm, quando comparadas com as formulações placebo dos estudos iniciais (72,4 μ S/cm). Estes fármacos possuem elevado carácter iónico, alterando muito a capacidade condutora das formulações, assim as formulações com os dois fármacos apresentam valores ainda mais elevados de condutividade.

Nas Tabelas 10, 11 e 12, encontram-se os gráficos que mostram a forma como os fatores analisados (APIs, trietanolamina e carbómero) influenciam as respostas (condutividade, pH e viscosidade) e se essa influência é estatisticamente significativa ou não.

Tabela 10: Influência de cada um dos fatores na resposta condutividade.

Term	Contrast	Plot of t-Ratio	Individual p-Value
APIs	1150.50		<.0001*
Trietanolamina	-34.55		0.0676
Carbómero	-10.47		0.5943
APIs*Trietanolamina	-19.79		0.2171
Trietanolamina*Trietanolamina	-9.58		0.6298
APIs*Carbómero	-12.56		0.4214
Trietanolamina*Carbómero	9.50		0.6322
APIs*Trietanolamina*Trietanolamina	-6.92		0.7289
APIs*Trietanolamina*Carbómero	15.32		0.3262

Tabela 11: Influência de cada um dos fatores na resposta pH.

Term	Contrast	Plot of t-Ratio	Individual p-Value
Carbómero	-0.534420		0.0050*
APIs	-0.422000		0.0097*
Trietanolamina	0.380132		0.0120*
Carbómero*Carbómero	0.033000		0.7401
Carbómero*APIs	0.192302		0.0501
Carbómero*Trietanolamina	-0.035777		0.7186
APIs*Trietanolamina	-0.087207		0.2647
Carbómero*Carbómero*APIs	-0.056000		0.4725
Carbómero*APIs*Trietanolamina	0.055902		0.5680

Tabela 12: Influência de cada um dos fatores na resposta viscosidade.

Term	Contrast	Plot of t-Ratio	Individual p-Value
Carbómero	0.809457		0.0757
APIs	0.359000		0.3490
Trietanolamina	-0.279508		0.4690
Carbómero*Carbómero	-0.117000		0.8069
Carbómero*APIs	0.187830		0.6907
Carbómero*Trietanolamina	0.156525		0.7413
APIs*Trietanolamina	0.547837		0.1774
Carbómero*Carbómero*APIs	-0.233000		0.6245
Carbómero*APIs*Trietanolamina	0.532184		0.1882

Analisando as tabelas verifica-se que a condutividade é influenciada de forma estatisticamente significativa (ver * no valor de individual de p) apenas pela presença de API.

Como este efeito é muito acentuado podemos concluir que o valor da condutividade não poderá ser utilizado para inferir diferenças entre as proporções das fases aquosa e lipofílica nestas formulações como era o objetivo inicial.

Analisando a Tabela 11 verifica-se que o pH é influenciado de forma estatisticamente significativa (* no valor de individual de p) pela presença de API, % de carbómero e % de TEA. Pode ainda verificar-se que tantos os APIs como o carbómero induzem a diminuição do pH (valor negativo na coluna *Contrast*) enquanto que a TEA tem um efeito oposto (valor positivo na coluna *Contrast*).

Através da Tabela 12 verifica-se que o fator que mais influencia a resposta viscosidade é o carbómero embora o valor de p não nos permita dizer que esta influência é estatisticamente significativa. O que parece acontecer é que a viscosidade é influenciada por vários fatores e interações de fatores de uma forma muito complexa pelo que o número de experiências realizadas não permitiram obter uma equação de resposta robusta o suficiente para explicar toda esta complexidade.

Os parâmetros estatísticos obtidos para as equações de resposta da formulação A encontram-se na Tabela 13, pode-se verificar que se conseguiram obter equações de resposta bastante robustas para o pH e condutividade, embora para a viscosidade seja um pouco menos robusta.

Tabela 13: Parâmetros estatísticos obtidos para a formulação A nos estudos iniciais.

Resposta	R²	p
pH	0,975	0,0003
Condutividade	0,999	0,0439
Viscosidade	0,787	0,0193

Formulação B

Na formulação B, quando são adicionados os dois APIs à formulação verifica-se que os valores de condutividade aumentam drasticamente para valores próximos de 3500 μ S/cm (tal como já se tinha verificado no caso da formulação A), quando comparadas com as formulações executadas nos estudos iniciais (389 μ S/cm).

Nas Tabelas 14, 15 e 16, encontram-se os gráficos que mostram de que forma é que os fatores analisados (APIs, trietanolamina e carbómero) influenciam as respostas (condutividade, pH e viscosidade) e se essa influência é estatisticamente significativa ou não.

Tabela 14: Influência de cada um dos fatores na resposta condutividade.

Term	Contrast	Plot of t-Ratio	Individual p-Value
APIs	1438.80		0.0001*
Carbómero	22.47		0.4305
Trietanolamina	3.39		0.9275
APIs*Carbómero	-59.05	*	0.0798
Carbómero*Carbómero	-18.88	*	0.6041
APIs*Trietanolamina	-29.93	*	0.3017
Carbómero*Trietanolamina	53.46	*	0.1022
Trietanolamina*Trietanolamina	19.36	*	0.5940
APIs*Carbómero*Carbómero	-17.89	*	0.6245

Tabela 15: Influência de cada um dos fatores na resposta pH.

Term	Contrast	Plot of t-Ratio	Individual p-Value
Carbómero	-0.591440		0.0008*
Trietanolamina	0.319006		0.0050*
APIs	-0.308038		0.0056*
Carbómero*Carbopol	-0.004841	*	0.9347
Carbómero*Trietanolamina	0.018041	*	0.7639
Trietanolamina*Trietanolamina	0.069415	*	0.1808
Carbómero*APIs	0.160460	*	0.0273*
Trietanolamina*APIs	-0.052846	*	0.2864
Carbómero*Carbómero*APIs	-0.010954	*	0.8497

Tabela 16: Influência de cada um dos fatores na resposta viscosidade.

Term	Contrast	Plot of t-Ratio	Individual p-Value
APIs	-3.37700		0.0032*
Carbómero	1.04536		0.0560
Trietanolamina	0.33424		0.4371
APIs*Carbómero	-0.45362	*	0.2987
Carbómero*Carbómero	-0.02826	*	0.9581
APIs*Trietanolamina	0.31910	*	0.4612
Carbómero*Trietanolamina	0.31569	*	0.5593
Trietanolamina*Trietanolamina	0.10642	*	0.8452
APIs*Carbómero*Carbómero	-0.11137	*	0.8378

Analisando a tabela da condutividade verifica-se que ela é influenciada de forma estatisticamente significativa (ver* no valor individual de p) apenas pela presença de API. Mais uma vez se verifica que, como este efeito é muito acentuado, o valor de condutividade não poderá ser utilizado para inferir diferenças entre as proporções das fases aquosa e oleosa nestas formulações como era o objetivo inicial.

Analisando a Tabela 15 verifica-se que o pH é influenciado de forma estatisticamente significativa (* no valor de individual de p) pela presença de API, % de carbómero e de TEA e pela interação carbómero*APIs. Pode ainda verificar-se que tantos os APIs como o carbómero induzem a diminuição do pH (valor negativo na coluna *Contrast*) enquanto que a % de TEA e a interação carbómero*APIs têm um efeito oposto (valor positivo na coluna *Contrast*). Este comportamento é semelhante ao verificado para a formulação A.

Analisando a Tabela 16 verifica-se que o fator que mais influencia a resposta viscosidade é a presença de substâncias ativas (de forma negativa e estatisticamente

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais significativa) e o fator que mais influencia de forma positiva esta resposta é a % de carbómero com um valor de p muito próximo de 0,05 que é considerado o valor para que a influência possa ser considerada estatisticamente significativa. Os resultados da viscosidade da formulação B são bastante diferentes dos resultados observados para a formulação A apesar da % de carbómero, trietanolamina e APIs ser igual nas duas formulações. Estas diferenças podem ser devidas ao facto de os restantes componentes da formulação serem diferentes.

Os parâmetros estatísticos obtidos para o modelo da formulação B após escolha dos fatores que mais influenciam cada resposta encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17: Parâmetros estatísticos obtidos para a formulação B nos estudos iniciais.

Resposta	R²	P
pH	0,993	<0,0001
Condutividade	0,997	<0,0001
Viscosidade	0,971	<0,0001

Pode-se verificar que se conseguiram equações de resposta bastante robustas para o pH, condutividade e viscosidade.

2º Estudo – Otimização das formulações

Como o objetivo do trabalho era desenvolver uma formulação para administração tópica de dois anestésicos que preenchesse os requisitos do TPP definido inicialmente removeram-se do DoE as formulações placebo e aumentou-se o desenho de experiências para mais um ponto intermédio (11) e um ponto com os limites máximos de carbómero e TEA (12). É muito importante ter pontos centrais no desenho para uma boa definição de modelos matemáticos de resposta não lineares. Foram preparadas estas novas formulações e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 18 (formulação A) e na Tabela 19 (formulação B). Os gráficos de viscosidade para estas formulações encontram-se no Anexo I – Gráficos 13 e 14, para a formulação A e Gráficos 15 e 16 para a B.

Tabela 18: Resultado das experiências do aumento do DoE para a Formulação A.

Nº	Carbómero (%)	TEA (%)	Respostas obtidas		Respostas previstas	
			pH ($\bar{x} \pm \sigma$)	Viscosidade (Pa.s) ($\bar{x} \pm \sigma$)	pH	Viscosidade (Pa.s)
1	1	2,5	6,37±0,064	0,27±0,017	6,40	0,27
2	1,5	2	5,74±0,052	2,73±0,248	5,70	1,95
5	2	1,5	4,95±0,045	1,90±0,171	4,99	2,32
7	1	1,5	5,76±0,032	1,21±0,067	5,75	1,59
8	2	2,5	5,65±0,021	4,04±0,339	5,64	3,63
11	2	2	5,34±0,015	3,04±0,029	5,31	2,97
12	2	2,5	5,62±0,015	3,19±0,042	5,64	3,63

Tabela 19: Resultado das experiências do aumento do DoE para a Formulação B.

Nº	Carbómero (%)	TEA (%)	Respostas obtidas		Respostas previstas	
			pH ($\bar{x} \pm \sigma$)	Viscosidade (Pa.s) ($\bar{x} \pm \sigma$)	pH	Viscosidade (Pa.s)
1	1	2,5	6,73±0,049	1,10±0,032	6,73	1,16
5	2	1,5	5,21±0,010	0,94±0,015	5,22	1,01
7	1	1,5	6,07±0,010	0,60±0,035	6,07	0,66
8	2	2,5	5,93±0,010	3,63±0,260	5,94	3,48
10	1,5	2	6,01±0,012	1,77±0,229	5,99	1,53
11	2	2	5,58±0,015	2,17±0,040	5,58	2,15
12	2	2,5	5,94±0,015	3,98±0,133	5,94	3,84

Os parâmetros estatísticos do novo DoE encontram-se na Tabela 20 para a formulação A e na Tabela 21 para a B.

Tabela 20: Parâmetros estatísticos obtidos para o aumento do DoE da formulação A.

Resposta	R²	p
pH	0,976	<0,0001
Viscosidade	0,669	0,0069

Tabela 21: Parâmetros estatísticos obtidos para o aumento do DoE da formulação B.

Resposta	R²	p
pH	0,994	<0,0001
Viscosidade	0,956	<0,0001

Embora, quando comparados com os parâmetros dos DoE anteriores, os valores de R² se tenham afastado ligeiramente do valor de 1, em termos do valor de p (a probabilidade do modelo falhar) verifica-se uma grande diminuição, por isso pode-se considerar que estes modelos são melhores que os anteriores. Para este resultado deve ter contribuído a remoção dos resultados das formulações placebo pois, como foi verificado, os APIs influenciam as respostas avaliadas.

Foram desenhados os gráficos de contorno, e também os gráficos de superfície, para estes dois novos modelos.

Formulação A

Para a formulação A tendo em conta o novo modelo obtido foi desenhado um gráfico de contorno apresentado na Figura 25. Verifica-se que dentro dos limites de viscosidade e pH definidos, isto é, pH entre 5-6 e viscosidade maior que 2Pa.s, a zona de trabalho ideal (a branco na figura) partilha alguma área com a zona testada ([carbómero]=1-2% e [TEA]=1,5-2,5%).

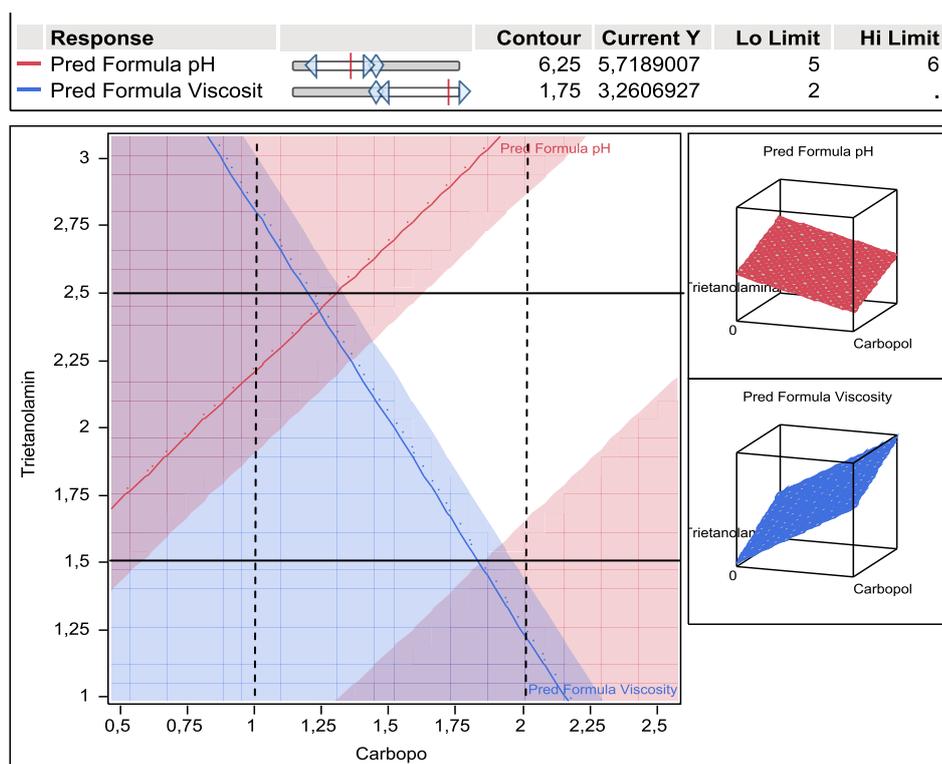


Figura 25: Gráfico de contorno da formulação A.

Desenhando o gráfico de superfície de resposta (Figura 26) do modelo obtido, consegue-se ter uma visão tridimensional dos resultados obtidos anteriormente e já apresentados no gráfico de contorno (Figura 25). Pela análise do gráfico verifica-se qual a zona onde as formulações da formulação A preenchem simultaneamente os requisitos de pH e de viscosidade previamente definidos (zona a laranja). Os limites a verde correspondem a pH e5 e 6 e a lilás o limite de viscosidade superior a 2,75Pa.s.

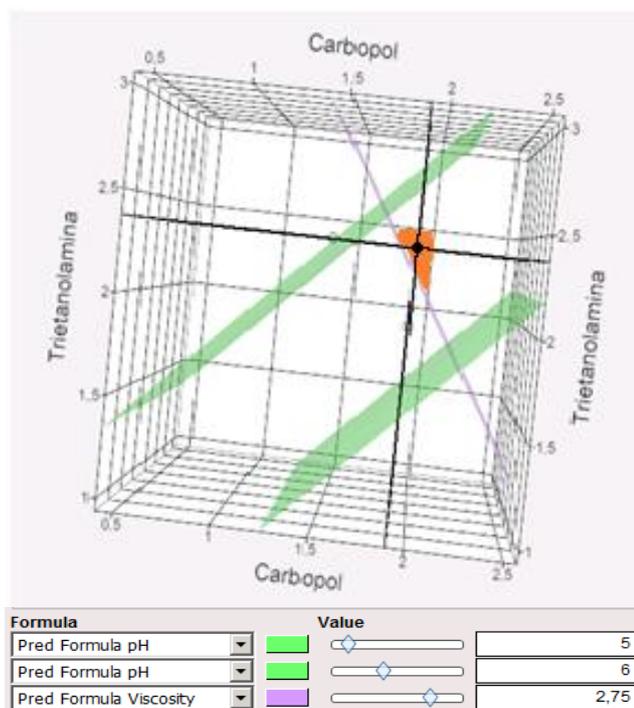


Figura 26: Zona de trabalho para a formulação A.

Dentro da nova zona de trabalho, a laranja, foi escolhido um ponto central que corresponde a 1,9% de carbómero e 2,45 de TEA (ponto central do triângulo laranja) e preparou-se esta nova formulação que foi considerada a formulação ideal. Para esta nova formulação os valores de pH e viscosidade previstos estão descritos no gráfico de perfil da Figura 27. Segundo o modelo matemático, esta formulação apresentará pH de 5,74 e viscosidade de 3,00Pa.s (eixo dos yy).

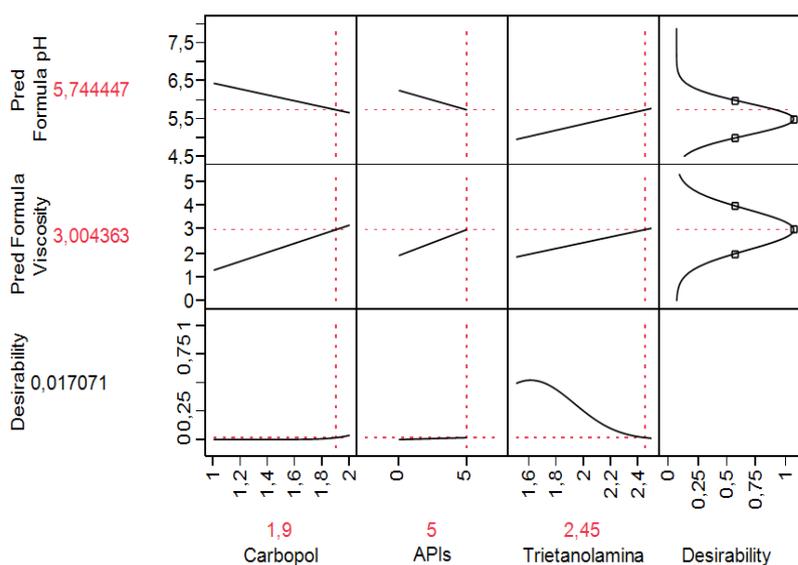


Figura 27: Gráfico de perfil para a formulação A com características ideais.

Formulação B

Para a formulação B tendo em conta o novo modelo foi também desenhado um novo gráfico de contorno (Figura 28). Verifica-se que dentro dos limites de viscosidade e pH definidos, isto é, pH entre 5-6 e viscosidade maior que 2,5Pa.s a zona de trabalho ideal (a branco na figura) partilha alguma área com a zona testada ([carbómero]=1-2% e [TEA]=1,5-2,5%). No caso da formulação B esta zona é bastante menor do que a encontrada para a formulação A.

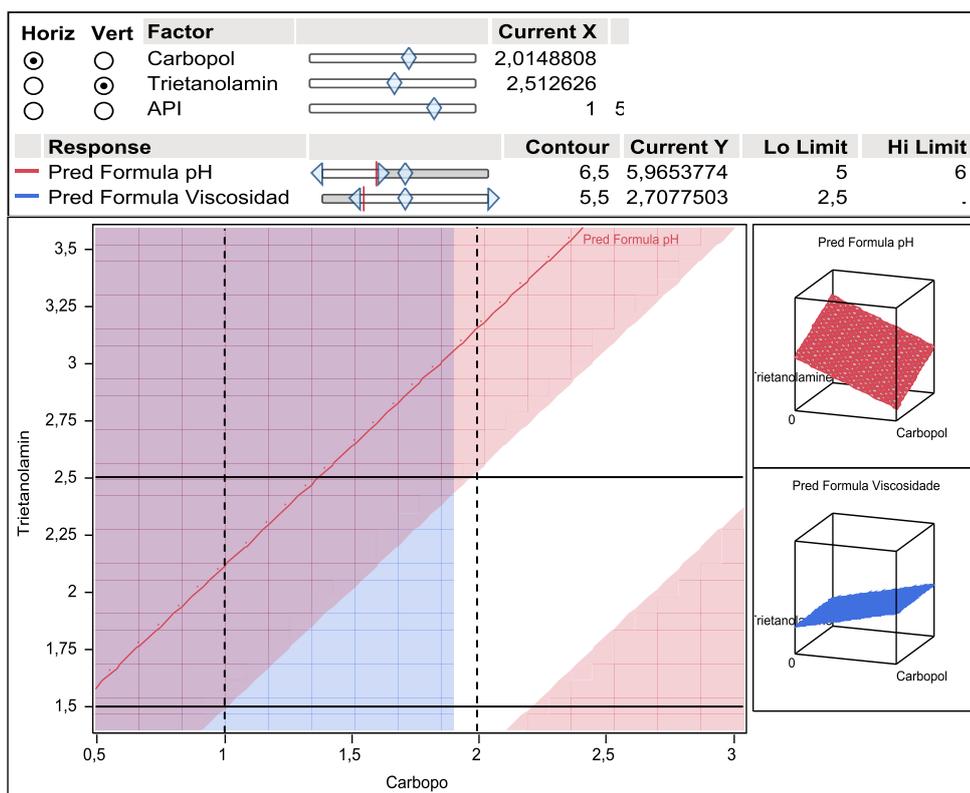


Figura 28: Gráfico de contorno para a formulação B.

Desenhando o gráfico de superfície de resposta (Figura 29) do modelo obtido, consegue-se ter uma visão tridimensional dos resultados obtidos anteriormente e já apresentados no gráfico de contorno da Figura 28. Pela análise do gráfico verifica-se qual a zona onde as formulações da formulação B preenchem simultaneamente os requisitos do pH e da viscosidade previamente definidos (zona a amarelo). Os limites a verde correspondem a pH 5 e 6 e a lilás o limite de viscosidade mínima de 2,5Pa.s.

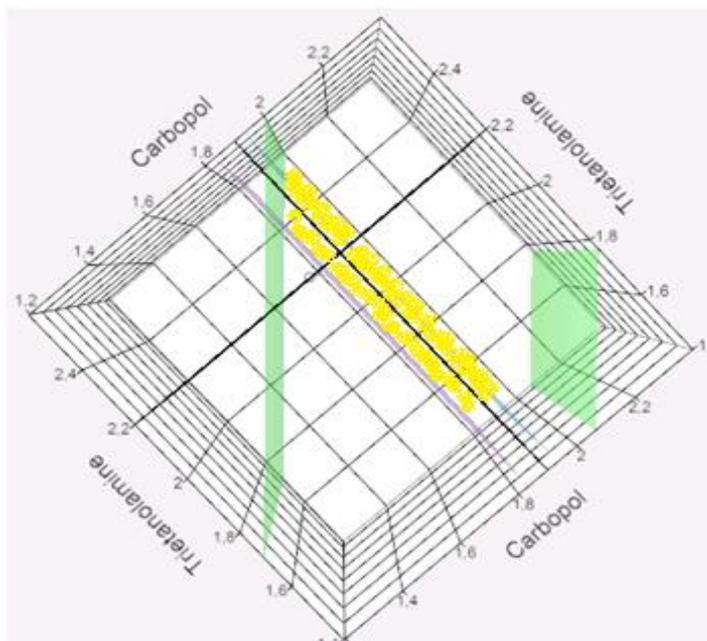


Figura 29: Zona de trabalho para a formulação B.

A interseção das linhas pretas da Figura 29 corresponde às concentrações de 1,9% de carbómero e 2,2% de TEA. Este ponto encontra-se numa zona central da área de trabalho e foi definido como sendo a formulação ideal estando as suas características previstas pelo modelo expressas no gráfico de perfil (Figura 30).

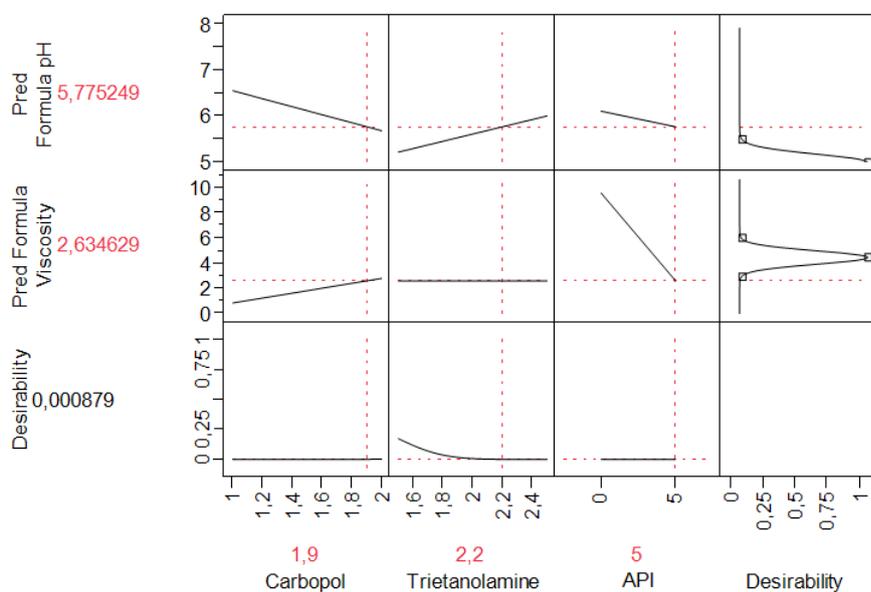


Figura 30: Gráfico de perfil para a formulação B ideal.

Segundo o modelo matemático, esta formulação apresentará pH 5,78 e viscosidade de 2,63Pa.s (eixo dos yy).

Os resultados de pH e viscosidade das formulações consideradas ideais nesta fase do trabalho encontram-se expressos nas Tabelas 22 e 23 e permitiram ajustar os modelos matemáticos de cada uma das formulações. Como tal, as novas tabelas contêm os resultados previstos para pH e viscosidade pelos novos modelos matemáticos. Os gráficos de viscosidade para as formulações ideais encontram-se no Anexo I – Gráficos 17 e 18.

Tabela 22: Resultado da formulação ideal e resultados previstos para a Formulação A.

Nº	Carbómero (%)	TEA (%)	Respostas obtidas		Respostas previstas	
			pH ($\bar{x} \pm \sigma$)	Viscosidade (Pa.s) ($\bar{x} \pm \sigma$)	pH	Viscosidade (Pa.s)
1	1	2,5	6,37±0,064	0,27±0,017	6,41	0,35
2	1,5	2	5,74±0,052	2,73±0,248	5,70	1,86
5	2	1,5	4,95±0,045	1,90±0,171	4,99	2,24
7	1	1,5	5,76±0,032	1,21±0,067	5,74	1,47
8	2	2,5	5,65±0,021	4,04±0,339	5,66	3,37
11	2	2	5,34±0,015	3,04±0,029	5,33	2,81
12	2	2,5	5,62±0,015	3,19±0,042	5,66	3,37
13	1,9	2,45	2,11±0,272	5,77±0,012	5,70	3,02

Tabela 23: Resultado da formulação ideal e resultados previstos para a Formulação B.

Nº	Carbómero (%)	TEA (%)	Respostas obtidas		Respostas previstas	
			pH ($\bar{x} \pm \sigma$)	Viscosidade (Pa.s) ($\bar{x} \pm \sigma$)	pH	Viscosidade (Pa.s)
1	1	2,5	6,73±0,049	1,10±0,032	6,727	1,185
5	2	1,5	5,21±0,010	0,94±0,015	5,971	1,596
7	1	1,5	6,07±0,010	0,60±0,035	6,074	0,661
8	2	2,5	5,93±0,010	3,63±0,260	5,191	0,552
10	1,5	2	6,01±0,012	1,77±0,229	5,893	3,987
11	2	2	5,58±0,015	2,17±0,040	5,542	2,269
12	2	2,5	5,94±0,05	3,98±0,133	5,893	3,987
13	1,9	2,2	3,35±0,047	5,59±0,045	5,767	2,763

Os parâmetros estatísticos para os modelos matemáticos ajustados encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24: Parâmetros estatísticos obtidos para o DoE com inclusão das formulações ideais.

Formulação	Resposta	R ²	p
3	pH	0,990	<0,0001
	Viscosidade	0,769	0,0256
5	pH	0,972	<0,0001
	Viscosidade	0,960	0,0029

Em termos dos parâmetros estatísticos, a principal melhoria verificada é ao nível da robustez do modelo para a resposta viscosidade de ambas as formulações.

Com o reajuste dos modelos matemáticos foram desenhados novos gráficos de contorno (Figura 31 e Figura 33) e de superfície de resposta (Figura 32 e Figura 34).

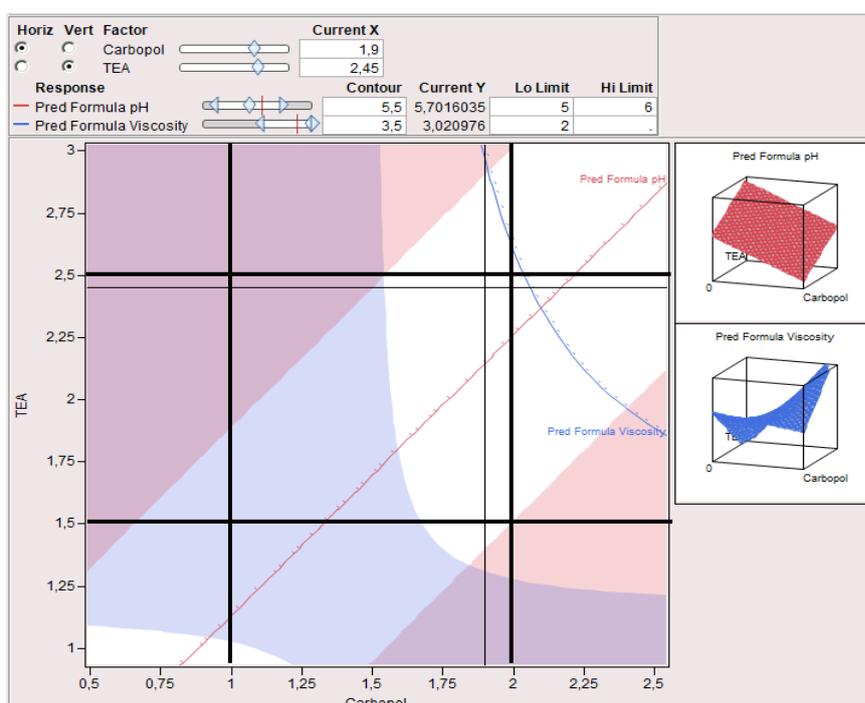


Figura 31: Gráfico de contorno para o DoE da formulação A com inclusão da formulação ideal.

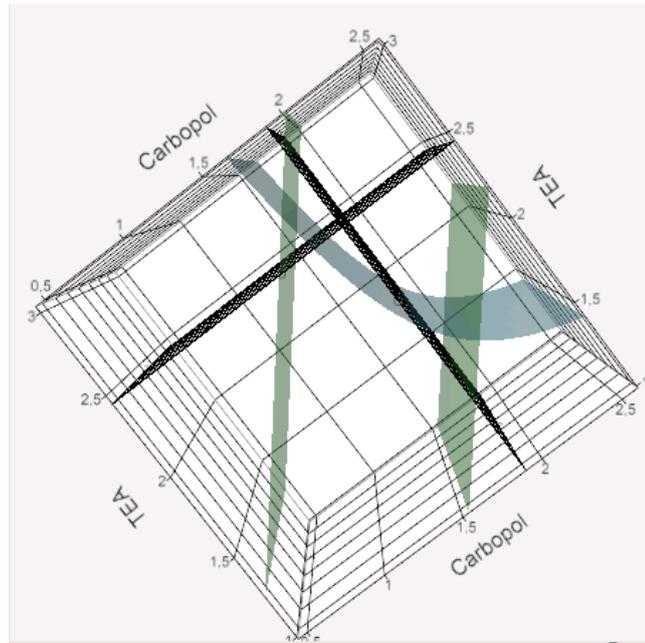


Figura 32: Gráfico da superfície de resposta para a formulação ideal que se verifica estar inserida dentro da zona de trabalho. Os valores de viscosidade encontram-se delimitados a verde e de pH a azul.

Pela análise das Figuras 31 e 32 confirma-se que a formulação A, considerada ideal nesta fase do trabalho (1,9% de carbómero e 2,45% de TEA), está incluída dentro da área de trabalho.

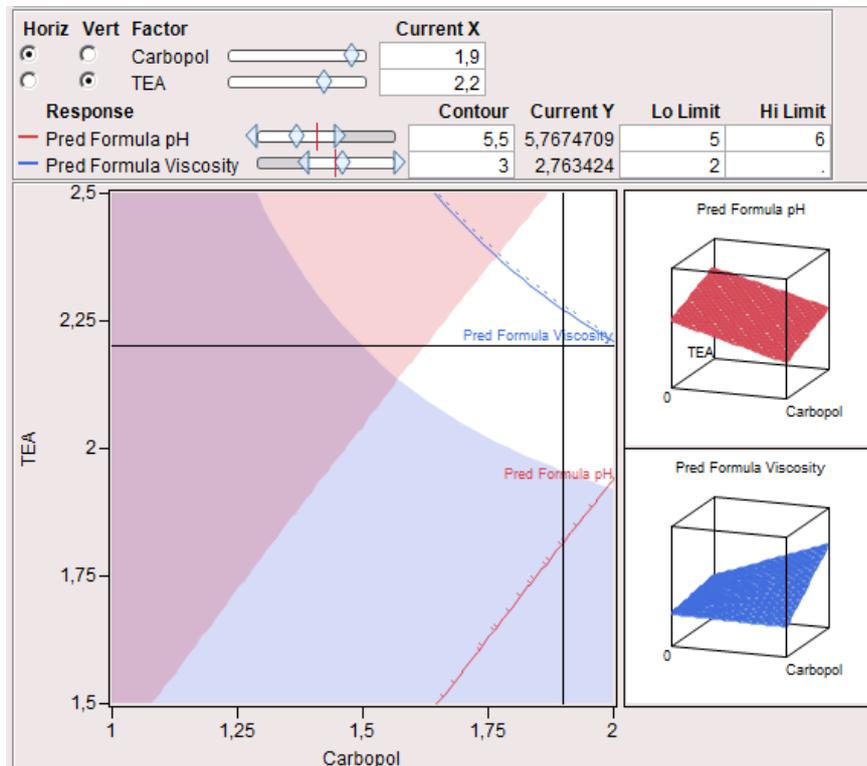


Figura 33: Gráfico de contorno para o DoE da formulação B com inclusão da formulação ideal.

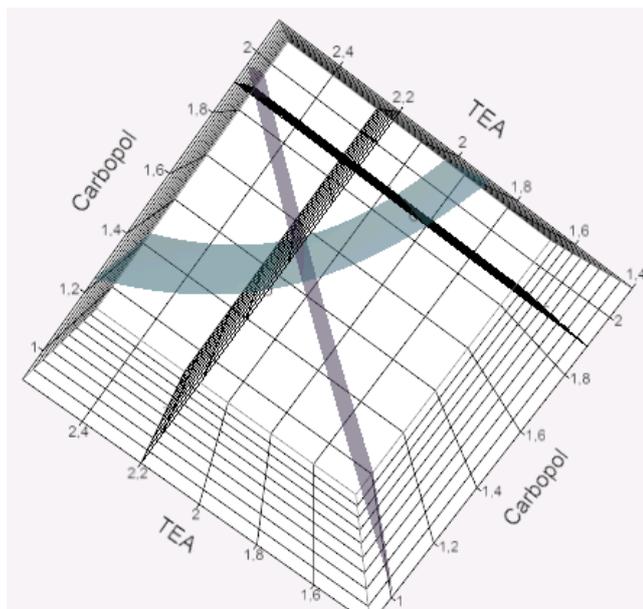


Figura 34: Gráfico da superfície de resposta para a formulação ideal que se verifica estar inserida dentro da zona de trabalho. Os valores de viscosidade encontram-se delimitados a azul e os de pH a roxo.

As mesmas conclusões se tiram da formulação B, ou seja, confirma-se que a formulação B, considerada ideal nesta fase do trabalho (1,9% de carbómero e 2,2% de TEA), está incluída dentro da área de trabalho.

3º Estudo – Estudos de libertação

De forma a assegurar o cumprimento das *sink conditions* durante os ensaios de libertação realizado nas células de Franz foi determinada a solubilidade da lidocaína HCl e prilocaína HCl no tampão fosfato pH 7,2 (meio de dissolução) (Tabela 25). Os testes de solubilidade foram efetuados de acordo com as indicações da Farmacopeia Europeia (Quality of Medicines, 2010).

Tabela 25: Solubilidade dos fármacos em tampão fosfato pH 7,2.

Fármaco	Solubilidade a 25°C (mg/ml)
Lidocaína HCl	1750
Prilocaína HCl	275

Os ensaios de libertação foram realizados durante 3h. As alíquotas de solução tampão de 500µl foram recolhidas para análise aos 15 e 30 minutos e após isso a cada 30 minutos,

Após recolha das amostras das células de Franz, foi determinada a percentagem de cada fármaco que foi sendo libertada ao longo do tempo por HPLC. Após a obtenção destes resultados selecionaram-se dois pontos da curva de libertação (os 30' e 120') para serem inseridos no DoE, de forma a tentar perceber se os fatores estudadas (% de carbómero, % de TEA e os fármacos) influenciam a libertação dos fármacos das formulações A e B na fase inicial e final da libertação. Os resultados médios encontram-se nas Tabelas 26 e 27, para as formulações A e B, respetivamente.

Apresentam-se também os resultados médios de viscosidade e pH, de forma poderem ser relacionados cada um destes parâmetros com a % de fármaco libertado.

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais

Tabela 26: Resultados das experiências do DoE para a Formulação A com lidocaína HCl e prilocaína HCl.

Nº	Carbómero (%)	TEA (%)	pH ($\bar{x} \pm \sigma$)	Viscosidade (Pa.s) ($\bar{x} \pm \sigma$)	Libertação 30' (%)		Libertação 120' (%)	
					Lid. HCl	Pril. HCl	Lid. HCl	Pril. HCl
1	1	2,5	6,37±0,064	0,27±0,017	47,05±24,16	54,45±25,93	93,30±16,81	106,57±18,88
2	1,5	2	5,74±0,052	2,73±0,248	35,67±5,02	40,53±6,08	74,85±6,79	84,09±10,45
5	2	1,5	4,95±0,045	1,90±0,171	30,93±5,21	32,76±5,28	62,46±6,22	66,78±7,08
7	1	1,5	5,76±0,032	1,21±0,067	34,25±3,78	36,53±4,71	81,27±4,04	86,30±4,86
8	2	2,5	5,65±0,021	4,04±0,339	25,39±4,40	27,70±4,25	57,86±10,80	62,69±11,66
11	2	2	5,34±0,015	3,04±0,029	38,18±1,49	40,15±1,75	74,56±3,08	78,59±3,31
12	2	2,5	5,62±0,015	3,19±0,042	28,09±5,94	30,41±6,10	61,18±10,52	65,65±9,89
13	1,9	2,45	5,77±0,012	2,11±0,272	51,71±7,48	55,33±8,75	85,28±8,72	93,89±11,21

Tabela 27: Resultado das experiências do DoE para a Formulação B com lidocaína HCl e prilocaína HCl.

Nº	Carbómero (%)	TEA (%)	pH ($\bar{x} \pm \sigma$)	Viscosidade (Pa.s) ($\bar{x} \pm \sigma$)	%libertação 30' (%)		%libertação 120' (%)	
					Lid. HCl	Pril. HCl	Lid. HCl	Pril. HCl
1	1	2,5	6,73±0,049	1,10±0,032	58,67±12,37	64,51±14,20	98,81±5,68	107,54±6,87
5	2	1,5	5,21±0,010	0,94±0,015	52,77±4,98	53,33±5,24	91,85±7,76	95,03±8,94
7	1	1,5	6,07±0,010	0,60±0,035	61,86±7,20	62,15±6,87	113,97±9,07	115,54±2,92
8	2	2,5	5,93±0,010	3,63±0,260	40,51±8,04	41,01±8,87	72,43±12,49	74,77±13,48
10	1,5	2	6,01±0,012	1,77±0,229	47,39±7,67	48,08±7,97	84,97±7,27	87,55±7,21
11	2	2	5,58±0,015	2,17±0,040	40,16±4,85	40,53±5,38	77,60±5,91	78,35±6,61
12	2	2,5	5,94±0,05	3,98±0,133	39,97±3,13	40,82±3,40	73,18±2,82	76,52±2,82
13	1,9	2,2	5,59±0,0453	,35±0,047	46,90±11,24	52,39±11,06	80,63±7,90	91,44±8,89

Os resultados de libertação dos fármacos foram introduzidos no programa de DoE para ambas as formulações. Para a formulação A, a libertação de ambos os fármacos não é influenciada de forma estatisticamente significativa pela % de carbómero e pela % de TEA nos intervalos de concentração estudados, apenas demonstra uma influência estatisticamente significativa a interação do fator carbómero*carbómero na libertação inicial de ambos os fármacos. O software parece indicar que o modelo de libertação dos fármacos a partir das formulações é afetado de forma estatisticamente significativa por fatores nulos, ou seja, fatores não considerados no DoE deste trabalho e portanto desconhecidos. Esses fatores nulos poderão ser os restantes excipientes das formulações (Tabela 28).

a			Lenth	Individual	Simultaneous
Term	Contrast		t-Ratio	p-Value	p-Value
Carbomero	0,38661		0,32	0,7828	1,0000
Trietanolamina	0,00334		0,00	0,9977	1,0000
Carbomero*Carbomero	-2,86673 *		-2,37	0,0456*	0,2103
Carbomero*Trietanolamina	0,64792 *		0,54	0,6476	1,0000
Trietanolamina*Trietanolamina	-0,96475 *		-0,80	0,3660	0,9898
Null7	-1,83644		-1,52	0,1275	0,5456
Null8	6,69379		5,53	0,0069*	0,0335*

b			Lenth	Individual	Simultaneous
Term	Contrast		t-Ratio	p-Value	p-Value
Trietanolamina	-2,81053		-0,51	0,6692	1,0000
Carbomero	-1,77322		-0,32	0,7843	1,0000
Trietanolamina*Trietanolamina	-3,67034 *		-0,67	0,5002	1,0000
Trietanolamina*Carbomero	4,13005 *		0,75	0,3930	0,9975
Carbomero*Carbomero	-1,41040 *		-0,26	0,8275	1,0000
Null7	-5,96919		-1,08	0,2357	0,8574
Null8	3,77123		0,68	0,4396	1,0000

c			Lenth	Individual	Simultaneous
Term	Contrast		t-Ratio	p-Value	p-Value
Carbomero	0,34693		0,41	0,7248	1,0000
Trietanolamina	0,09360		0,11	0,9238	1,0000
Carbomero*Carbomero	-3,80851 *		-4,48	0,0157*	0,0608
Carbomero*Trietanolamina	0,78561 *		0,92	0,3017	0,9449
Trietanolamina*Trietanolamina	-0,87616 *		-1,03	0,2615	0,8870
Null7	5,72718		6,74	0,0070*	0,0245*
Null8	-4,09128		-4,82	0,0139*	0,0537

d			Lenth	Individual	Simultaneous
Term	Contrast		t-Ratio	p-Value	p-Value
Trietanolamina	-2,79944		-0,62	0,6188	1,0000
Carbomero	-1,76683		-0,39	0,7527	1,0000
Trietanolamina*Trietanolamina	-4,36054 *		-0,96	0,2862	0,9237
Trietanolamina*Carbomero	4,33246 *		0,96	0,2896	0,9278
Carbomero*Carbomero	-3,02091 *		-0,67	0,5627	1,0000
Null7	-7,28696		-1,61	0,1180	0,5027
Null8	2,41821		0,53	0,6700	1,0000

Tabela 28: Fatores que interferem na libertação de fármacos na formulação A (a - lidocaína HCl aos 30'; b - lidocaína HCl aos 120'; c – prilocaína HCl aos 30'; d – prilocaína HCl aos 120').

Os fatores nulos derivam do mero acaso, são apenas uma possibilidade e só servem para comprovar ou rejeitar uma hipótese, não devendo ser considerados no modelo, uma vez que não são controláveis (SAS Institute 2013).

Na Tabela 29 encontram-se os gráficos relativos à formulação B, que mostram de que forma é que os fatores analisados influenciam a libertação de ambos os fármacos numa fase inicial (30') e numa fase final (120') e se essa influência é estatisticamente significativa ou não.

a			Lenth	Individual	Simultaneous
Term	Contrast		t-Ratio	p-Value	p-Value
Carbomero	-6,75884		-3,14	0,0260*	0,1406
Trietanolamina	-2,90529		-1,35	0,1630	0,6611
Carbomero*Carbomero	1,30519		0,61	0,6129	1,0000
Carbomero*Trietanolamina	-1,49712 *		-0,70	0,4306	0,9998
Trietanolamina*Trietanolamina	1,37434 *		0,64	0,5939	1,0000
Null7	-0,85330		-0,40	0,7365	1,0000
Null8	-1,75421		-0,81	0,3540	0,9862
b			Lenth	Individual	Simultaneous
Term	Contrast		t-Ratio	p-Value	p-Value
Carbomero	-11,2824		-6,84	0,0052*	0,0246*
Trietanolamina	-6,3572		-3,86	0,0188*	0,0949
Carbomero*Carbomero	2,6048 *		1,58	0,1205	0,5243
Carbomero*Trietanolamina	-0,5247 *		-0,32	0,7913	1,0000
Trietanolamina*Trietanolamina	0,9847 *		0,60	0,6276	1,0000
Null7	1,1362		0,69	0,4454	1,0000
Null8	-1,0991		-0,67	0,5002	1,0000
c			Lenth	Individual	Simultaneous
Term	Contrast		t-Ratio	p-Value	p-Value
Carbomero	-7,43717		-3,21	0,0291*	0,1323
Trietanolamina	-1,83106		-0,79	0,3755	0,9905
Carbomero*Carbomero	1,25775 *		0,54	0,6525	1,0000
Carbomero*Trietanolamina	-2,45617 *		-1,06	0,2503	0,8597
Trietanolamina*Trietanolamina	0,96137 *		0,41	0,7336	1,0000
Null7	-0,17658		-0,08	0,9530	1,0000
Null8	-3,43793		-1,48	0,1340	0,5751
d			Lenth	Individual	Simultaneous
Term	Contrast		t-Ratio	p-Value	p-Value
Carbomero	-11,1858		-1,72	0,0987	0,4364
Trietanolamina	-4,7045		-0,72	0,4171	0,9985
Carbomero*Carbomero	1,5527 *		0,24	0,8420	1,0000
Carbomero*Trietanolamina	-1,6291 *		-0,25	0,8335	1,0000
Trietanolamina*Trietanolamina	-0,1343 *		-0,02	0,9864	1,0000
Null7	-4,3284		-0,67	0,5002	1,0000
Null8	-5,7188		-0,88	0,3242	0,9636

Tabela 29: Fatores que interferem na libertação dos fármacos da formulação B (a - lidocaína HCl aos 30'; b - lidocaína HCl aos 120'; c – prilocaína HCl aos 30'; d – prilocaína HCl aos 120').

Pela análise da Tabela 29 verifica-se que os resultados são bastante diferentes dos obtidos para a formulação A. A primeira conclusão que se pode retirar é que a % de carbómero afeta negativamente a libertação de ambos os fármacos nos dois tempos e que essa influência é quase sempre estatisticamente significativa. Também se verifica que a % de TEA parece ter uma influência negativa e estatisticamente significativa na libertação final da lidocaína, embora em todos os casos se verifique uma tendência para a % de TEA afetar a libertação dos fármacos na formulação B.

À semelhança do que se verificou para a formulação A, o software parece indicar que o modelo de libertação dos fármacos a partir das formulações é afetado de forma estatisticamente significativa por fatores nulos, ou seja, fatores não considerados no DoE

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais deste trabalho e portanto desconhecidos. Esses fatores nulos poderão ser os restantes excipientes da formulação.

Os resultados obtidos para ambas as formulações podem também dever-se a outros motivos como grande variabilidade das respostas obtidas por fatores não relacionados com a composição da formulação (ex: dificuldade em realizar ensaios de libertação em células de Franz de formulações muito líquidas, recolha manual das amostras, etc.). Desta forma, o aumento do número de experiências, poderia contribuir para a melhoria dos resultados do DoE e para a obtenção das equações de resposta para a libertação dos fármacos que não foi possível obter.

De seguida são apresentados exemplos de perfis de libertação para cada um dos fármacos para a formulação A e B ideais (Figura 35).

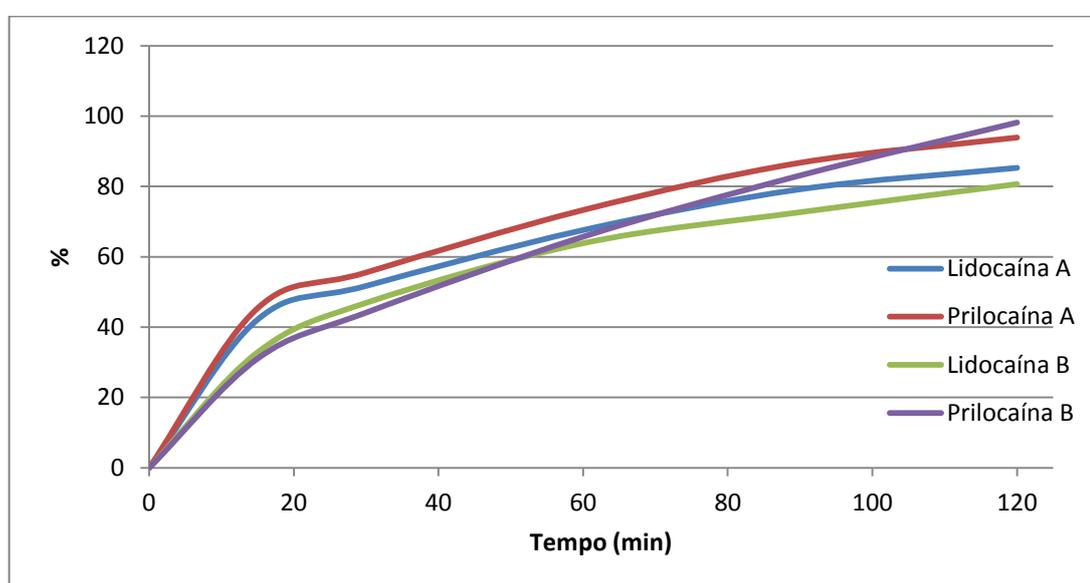


Figura 35: Formulação A e B ideais – curva média da % de libertação de lidocaína e prilocaína em função do tempo.

Observa-se que para ambas as formulações os perfis são muito semelhantes, atingindo ambas aos 120' valores superiores a 80% embora as formulações possuam pequenas diferenças na sua composição. Analisando também os resultados de libertação que se encontram nas Tabelas 28 e 29 parece haver uma tendência para a lidocaína ser libertada de forma ligeiramente mais lenta que a prilocaína e que a formulação B é a que apresenta valores de libertação de lidocaína e prilocaína mais semelhantes entre si. Os restantes perfis de libertação encontram-se no Anexo II – Gráficos 19 e 20, para a formulação A e Gráficos 21 e 22 para a B.

3. Resultados de microscopia

Os dois fármacos foram observados ao microscópio para se verificar a sua estrutura (Figura 36 e Figura 37).

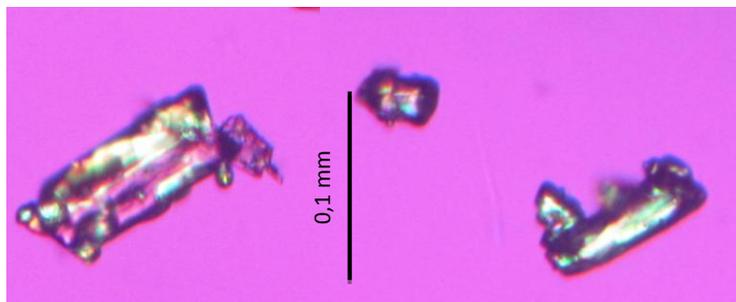


Figura 36: Imagem de microscopia ótica de lidocaína HCl (luz polarizada; ampliação de 100x).

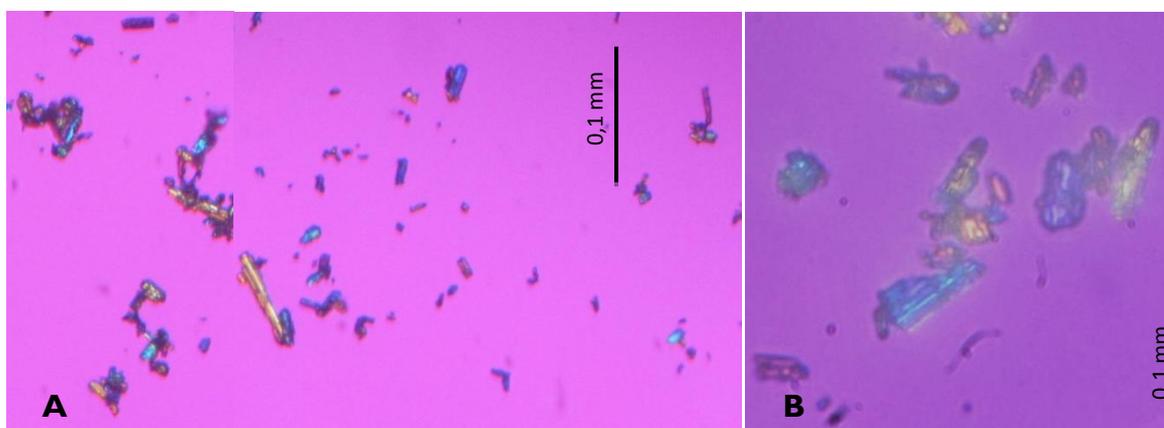


Figura 37: Imagem de microscopia ótica da prilocaína HCl (luz polarizada; ampliação: A - 100x / B - 400x).

Foram depois observadas as formulações com APIs ao microscópio para verificar se estavam presentes fármacos na forma cristalina (Figura 38 e Figura 39).



Figura 38: Formulação A com lidocaína HCl, observação ao microscópio.

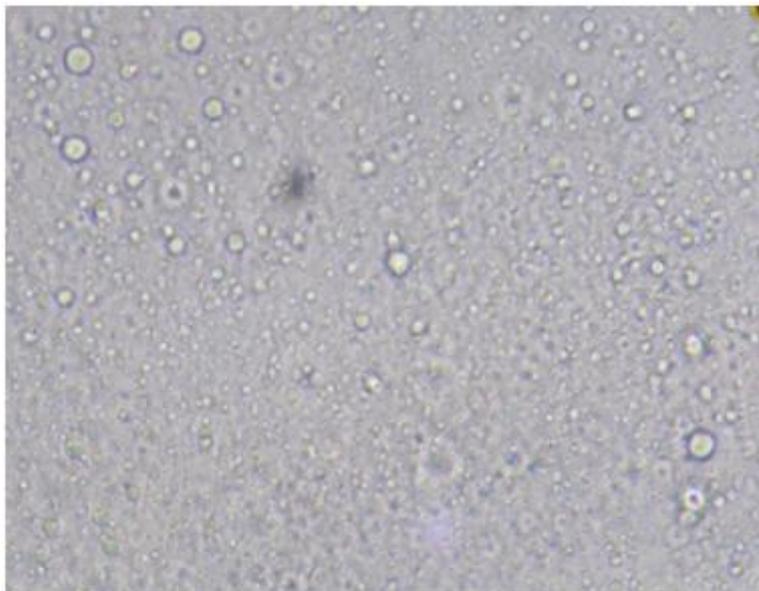


Figura 39: Formulação A com prilocaína HCl, observação ao microscópio.

Em nenhuma das formulações se consegue observar os fármacos na sua forma cristalina, pelo que se deverão encontrar dissolvidos na formulação, e por isso em concentração inferior à sua solubilidade nas formulações. Esta característica é importante, pois para os fármacos penetrarem na pele têm que se encontrar na forma dissolvida (Formariz et al., 2005).

Conclusão

O trabalho foi iniciado pela definição do TPP da formulação que se pretendia desenvolver. Esta definição detalhada dos objetivos específicos a atingir foi muito importante para o planeamento do trabalho e para a seleção dos fatores e respetivos níveis que deveriam ser estudados de forma sistemática, com auxílio da ferramenta de desenho de experiências JMP, de forma a conseguirmos alcançar uma formulação que preenchesse esses requisitos.

O trabalho laboratorial começou pela realização de estudos de pré-formulação que serviram para conseguir reduzir o número de formulações de 4 para 2 (formulação A e B), permitiram ainda selecionar o agente gelificante mais adequado e estável e o método de preparação mais adequado à composição, viscosidade e tipo de formulações (microemulsões). Verificou-se ainda que as substâncias ativas alteravam o pH e a viscosidade das formulações com carbómero de forma muito significativa, pelo que se teria que incorporar um agente neutralizante que corrigisse este problema em estudos futuros. De seguida foi estudada a influência da % carbómero, % TEA e presença de APIs nas respostas condutividade, pH e viscosidade nas duas formulações em estudo (A e B). De uma forma genérica verificou-se que os três fatores influenciavam o pH das formulações, que o carbómero influenciava a viscosidade de ambas as formulações e que, curiosamente, no caso da formulação B também a presença dos APIs tinha uma influência estatisticamente significativa na viscosidade. No caso da condutividade, o fator que demonstrou ter uma maior influência no seu resultado foi a presença de APIs.

As formulações com os dois APIs foram depois otimizadas recorrendo ao DoE e os modelos matemáticos obtidos permitiram determinar, para cada formulação, a zona de trabalho onde as formulações preenchiam simultaneamente os requisitos de pH e viscosidade e foi selecionada, com base nestes resultados, a composição ideal da formulação A e B.

Os resultados dos estudos de libertação indicam que, de uma forma genérica, parecia haver uma tendência para a lidocaína ser libertada um pouco mais lentamente que a prilocaína e que a formulação B é aquela que apresenta valores de libertação de lidocaína e prilocaína mais semelhantes entre si. Não se verificou haver uma diferença muito marcada entre os resultados de libertação dos APIs a partir da formulação A e da formulação B.

Outra importante conclusão que se foi tirando ao longo do estudo é que a formulação B foi a que sempre demonstrou ter maior reprodutibilidade nos resultados

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação para administração tópica de anestésicos locais

alcançados, por isso, parece ser nesta altura a mais robusta. Por esse motivo e porque ambas as formulações sempre demonstraram propriedades adequadas deverá ser a formulação B a escolhida para o caso de o trabalho continuar.

Perspetivas futuras

O próximo passo no desenvolvimento deste projeto deverá passar pela preparação de mais formulações B e a realização dos respetivos ensaios de libertação de forma a conseguir obter equações de resposta robustas

Como o objetivo do trabalho é desenvolver uma formulação para aplicação de anestésicos locais na pele, o passo seguinte deverá ser a realização de estudos de absorção / permeação cutânea que permitam otimizar a formulação, de forma a alcançar uma formulação com um início de ação mais rápido que a formulação comercial (EMLA®). Para tal dever-se-á usar o EMLA como produto de referência nos ensaios de absorção / permeação cutânea.

Seria também importante a realização de estudos mais completos de estabilidade da formulação B.

Referências bibliográficas

ALBERTO, Manuel Ana Mário (2013) - "Planeamento de Experiências e Controlo de Qualidade na Indústria : Revisão e aplicação metodológica". Tese de Mestrado, Universidade Aberta.

APP Pharmaceuticals, LLC (2008) - "EMLA CREAM RCM". November: 1–2.

Astra Zeneca Produtos Farmacêuticos, Lda (2010a) - "Emla Cream: Patch Lidocaine, Patch Topical Anesthetic, and Dermal Analgesia".

AstraZeneca Produtos Farmacêuticos, Lda (2010b) - "Folheto Informativo EMLA".

BENSON, Heather A. E.; Watkinson, Adam C. (2012) - "Transdermal and Topical Drug Delivery". John Wiley & Sons, Inc; Canadá.

BOGDUK, N; MERSKEY, H. (1994) - "IASP Taxonomy". 209–214.

BRANNING, Ronald; TORBECK, Lynn (2009) - "QbD: Convincing the Skeptics". BioPharmaceuticals International, 225.

BROWN, Cynthia K.; CHOKSHI, Hitesh P.; NICKERSON, Beverly; REED, Robert A.; ROHRS, Brian R.; SHAH, Pankaj A. (2004) - "Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds". *Pharmaceutical Technology*: 56–65. Disponível na Internet: www.pharmtech.com.

CARR, Daniel B.; GOUDAS, Leonidas C. (1999) - "Acute pain". *Lancet*, 353: 2051–2058.

CEREDA, Cíntia Maria Saia; ARAÚJO, Daniele Ribeiro de; BRUNETTO, Giovana Bruschini; PAULA, Eneida de (2004) - "Liposomal prilocaine: preparation, characterization, and in vivo evaluation". *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 7(2): 235–240.

CHEN, Huabing; CHANG, Xueling; DU, Danrong; LI, Jin; XU, Huibi; YANG, Xiangliang (2006) - "Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery". *International Journal of Pharmaceutics*, 315(1-2): 52–8. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600540>.

CHOPRA, Shruti; MOTWANI, Sanjay K.; IQBAL, Zeenat; TALEGAONKAR, Sushma; AHMAD, Farhan J.; KHAR, Roop K. (2007) - "Optimisation of polyherbal gels for vaginal

drug delivery by Box-Behnken statistical design”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(1): 120–31. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17270408>.

CONTRERAS, M. D.; SÁNCHEZ, R. (2002a) - “Application of a factorial design to the study of the flow behavior, spreadability and transparency of a Carbopol ETD 2020 gel. Part II”. *International Journal of Pharmaceutics*, 234(1-2): 149–157. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839446>.

CONTRERAS, M. D.; SÁNCHEZ, R. (2002b) - “Application of a factorial design to the study of specific parameters of a Carbopol ETD 2020 gel. Part I. Viscoelastic parameters”. *International Journal of Pharmaceutics*, 234(1-2): 139–147. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839445>.

DELGADO, Inês Margarida Ferreira (2012) - “Aplicação do desenho de experiências na optimização da quantificação de isocianatos livres em materiais em contacto com alimentos”. Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.

DEW, Noel (2011) - "Catanionic Aggregates in Gels". Tese de Doutoramento, Uppsala University, ISBN: 978-91-554-8019-6.

DJORDJEVIC, Ljiljana; PRIMORAC, Marija; STUPAR, Mirjana; KRAJISNIK, Danina (2004) - “Characterization of caprylocaproyl macroglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug”. *International Journal of Pharmaceutics*, 271(1-2): 11–19. Disponível na Internet: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517303006069>.

“Drugs Information Online”. Disponível na Internet: http://drugline.org/img/drug/8462_8538_3.jpg. Consultado em 3 de setembro de 2013.

EICKE, Hans-friedrich; BORKOVEC, Michal; DAS-GUPTA, Bikram (1989) - “Conductivity of water-in-oil microemulsions: A quantitative charge fluctuation model”. *The Journal of Physical and Chemistry*, 93: 314–317.

ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; KETTANEH-WOLD, N.; WIKSTRÖM, C.; WOLD, S. (2008) - "Design of Experiments: Principles and Applications". 3rd Edition, Umetrics Academy, Sweden. Disponível na Internet: http://www.google.pt/books?id=mgoHFzEpg5oC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

ESTEVENES, Maria Catarina Oliveira Machuco (2010) - “Definição de estratégia Quality by Design (QbD) baseada em Process Analytical Technology (PAT) no desenvolvimento e produção de medicamentos genéricos”. Tese de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa.

FDA (1997) - “Guidance for industry nonsterile semisolid dosage forms scale-up and postapproval changes: Chemistry, manufacturing, and controls; In vitro release testing and In vivo bioequivalence documentation”.

FORMARIZ, Thalita Pedroni; URBAN, Maria Cristina Cocenza; JÚNIOR, Arnóbio Antônio da Silva; GREMIÃO, Maria Palmira Daflon; OLIVEIRA, Anselmo Gomes de (2005) - “Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos”. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 41(03).

FRIEDMAN, Paul M.; MAFONG, Erick A.; FRIEDMAN, Edward S.; GERONEMUS, Roy G. (2001) - “Topical anesthetics update: EMLA and beyond”. American Society for Dermatologic Surgery, 27(12): 1019–1026. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849263>. Consultado em 26 de outubro de 2012.

GAJRAJ, Noor M.; PENNANT, John H.; MEHERNOOR, F. (1994) - “Eutectic Mixture of Local Anesthetics (EMLA®) cream”. International Anesthesia Research Society, 78: 574–583.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J.; GÓMEZ, E. (2000) - “Xanthan gum: production, recovery, and properties”. Biotechnology Advances, 18(7): 549–79. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14538095>.

GARRETT, R.; GRISHAM, C. (2004) - "Biochemistry". 3rd edition, Brooks Cole. ISBN: 0534490336.

GIBALDI, Milo; FELDMAN, Stuart (1967) - “Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations”. Journal of Pharmaceutical Sciences, 56(10): 1238–1242.

HALLDIN, Christina (2011) - "Photodynamic therapy - pain and aspects of pain relief". University of Gothenburg, Sweden.

HARRIS, Maria Inês Nogueira de Camargo (2003) - "Pele - Estrutura, propriedades e envelhecimento". 3ª edição. São Paulo.

HENNOCK, M.; RAHALKAR, R. R.; RICHMOND, P. (1984) - “Effect of xanthan gum upon the rheology and stability of oil-water emulsions”. Journal of Food Science, 49(5):

1271–1274. Disponível na Internet: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1984.tb14968.x>.

HUA, L; WEISAN, P.; JIAYU, L.; YING, Z. (2004) - “Preparation, evaluation, and NMR characterization of vinpocetine microemulsion for transdermal delivery”. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 30(6): 657–66. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15285339>. Consultado em 9 de abril de 2013.

ICH (2005) - “Quality Risk Management Q9”. Disponível na Internet: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf.

ICH (2008) - “Pharmaceutical Quality System Q10”. Disponível na Internet: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf.

ICH (2009) - “Pharmaceutical Development Q8 (R2)”. Disponível na Internet: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10_Guideline.pdf.

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (2013) - “Infomed”. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/infomed/pesquisa.php>.

JOEL, Katz; MELZACK, Ronald (1999) - “Measurement of pain”. *Surgical Clinics of North America*, 79(2): 231–252.

Johns Hopkins Medical Institutions (2001) - “Anatomy of skin”. Disponível na Internet: http://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/conditions/adult/dermatology/anatomy_of_the_skin_85,P01336/.

KAHLE, Kimberly; FOLEY, Joe P. (2006) - “Chiral microemulsion electrokinetic chromatography: Effect of cosurfactant identity on enantioselectivity, methylene selectivity, resolution, and other chromatographic figures of merit”. *Electrophoresis*, 27(21): 4321–33. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17075937>. Consultado em 9 de abril de 2013.

KATZBAUER, Barbara (1998) - “Properties and applications of xanthan gum”. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3): 81–84. Disponível na Internet: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391097001808>.

KERMANY, Bahador Poorahmary (2010) - "Carbopol hydrogels for topical administration: Treatment of wounds". Tese de Mestrado, Universidade de Tromsø.

KUNDU, Suriti; ACHAR, Suraj (2002) - "Principles of office anesthesia: Part II. Topical anesthesia". *American Family Physician*, 66(1): 99–102.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. (2000) - "Microemulsion-based media as novel drug delivery systems". *Advanced drug delivery reviews*, 45(1): 89–121. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104900>.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. (2006) - "A novel dispersion method comprising a nucleating agent solubilized in a microemulsion, in polymeric matrix II. Microemulsion characterization". *Journal of Colloid and Interface Science*, 302(1): 322–329. Disponível na Internet: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979706005224>. Consultado em 10 de abril de 2013.

LUBRIZOL (1998) - "Formulating Hydroalcoholic Gels with Carbopol Polymers". Disponível na Internet: <http://www.lubrizol.com/Home-Care/Documents/Technical-Data-Sheets/TDS-255-Formulating-Hydroalcoholic-Gels-with-Carbopol-Polymers.pdf>.

LUBRIZOL (2011) - "Polymers for Pharmaceutical Applications". Disponível na Internet: <http://www.lubrizol.com/Pharmaceutical-Ingredients/Documents/Bulletins/Bulletin-01---Polymers-for-Pharmaceutical-Applications.pdf>.

MARTINS, Rita Maria Fernandes Morais; VEIGA, Francisco (2002) - "Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38(1): 33–54.

MCEVOY, Eamon (2008) - "The development and application of oil-in-water microemulsion liquid and electrokinetic chromatography for pharmaceutical analysis". Tese de Doutoramento, Waterford Institute of Technology.

MEHTA, S. K.; KAUR, Gurpreet; BHASIN, K. K. (2010) - "Tween-embedded microemulsions--physicochemical and spectroscopic analysis for antitubercular drugs". *AAPS Pharmaceutical Scientists Technology*, 11(1): 143–53. Disponível na Internet: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2850476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Consultado em 14 de março de 2013.

MERCLIN, Nadia; BRAMER, Tobias; EDSMAN, Katarina (2004) - "Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as vehicle". *Journal*

of Controlled Release, 98(1): 57–65. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15245889>. Consultado em 11 de outubro de 2012.

NOGUEIRA, Luciano José; MONTANARI, Carlos Alberto; DONNICI, Claudio Luis (2009) - "Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch". Revista Virtual de Química, 1 (3), 227-240. Disponível na Internet: <http://www.uff.br/RVQ>.

OHZEKI, Keiichi; KITAHARA, Masaki; SUZUKI, Noriko; TAGUCHI, Kyoji; YAMAZAKI, Yuki; AKIYAMA, Shinji; TAKAHASHI, Kentaro; KANZAKI, Yasushi (2008) - "Local anesthetic cream prepared from lidocaine-tetracaine eutectic mixture". Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 128(4): 611–6. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18379178>.

Ordem dos Farmacêuticos (2013) - "Primeiras conclusões da avaliação paralela de Quality-by-Design". Disponível na Internet: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/scid/ofWebInst_09/defaultArticleViewOne.asp?categoryID=1492&articleID=7154. Consultado em 3 de setembro de 2013.

PAPALAMPROU, Evdoxia M.; MAKRI, Eleousa A.; KIOSSEOGLOU, Vassilios D.; DOXASTAKIS, Georgios I. (2005) - "Effect of medium molecular weight xanthan gum in rheology and stability of oil-in-water emulsion stabilized with legume proteins". Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(12): 1967–1973. Disponível na Internet: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2159>. Consultado em 27 de fevereiro de 2013.

PEDROSO, Rene Antonio; CELICH, Kátia Lilian Sedrez (2006) - "Dor: quinto sinal vital, um desafio para o cuidar em enfermagem". Texto Contexto Enfermagem, 15(2): 270–276.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. (2000) - "Hydrogels in pharmaceutical formulations". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50(1): 27–46. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840191>.

PERMEGEAR (2005) - "PermeGear Franz Cells". Disponível na Internet: <http://www.permegear.com/index.html>. Consultado em 24 de agosto de 2013.

PODLOGAR, F.; GASPERLIN, M.; TOMSIC, M.; JAMNIK, A.; ROGAC, M. Bester (2004) "Structural characterisation of water-in-oil emulsions - Tween 40 / Emulphor 308 - isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods". International Journal of

Pharmaceutics, 276(1-2): 115–28. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113620>. Consultado em 9 de abril de 2013.

POLIZELLI, Marcos Alexandre; TELIS, Vânia Regina Nicoletti; AMARAL, Lia Q.; FEITOSA, Eloi (2006) - "Formation and characterization of soy bean oil/surfactant/water microemulsions". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 281(1-3): 230–236. Disponível na Internet: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775706001816>. Consultado em 5 de março de 2013.

Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (2010) - "European Pharmacopoeia, 7.0". 2365–2366; 2792–2795.

ROWE, Raymond C., SHESKEY, Paul J.; QUINN, Marian E. (2009) - "Handbook of Pharmaceutical Excipients". Sixth Edit. London: Pharmaceutical Press. ISBN. 978-0-85369-792-3.

ROZMAN, Branka; ZVONAR, Alenka; FALSON, Françoise; GASPERLIN, Mirjana (2009) - "Temperature-sensitive microemulsion gel: an effective topical delivery system for simultaneous delivery of vitamins C and E". *AAPS Pharmaceutical Scientists Technology*, 10(1): 54–61. Disponível na Internet: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2663664&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Consultado em 26 de dezembro de 2012.

SABADINI, Edvaldo - "Colloids and surfaces Group". Disponível na Internet: http://gcs.iqm.unicamp.br/?page_id=36. Consultado em 3 de setembro de 2013.

SAS Institute (2013) - "Design of Experiments (DOE) with JMP®". Disponível na Internet: <http://www.jmp.com/applications/doe/>. Consultado em 16 de agosto de 2013.

SCHMID-WENDTNER, M-H; KORTING, H. C. (2006) - "The pH of the skin surface and its impact on the barrier function". *Skin pharmacology and physiology*, 19(6): 296–302. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16864974>. Consultado em 15 de agosto de 2013.

SHIVHARE, Mahesh; MCCREATH, Graham (2010) - "Practical Considerations for DoE Implementation in Quality By Design". *BioProcess Technical*, June.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. (2010) - "Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas". *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 31(3): 125–131.

SILVA, Luiz Francisco Jones Soares da (2009) - “Nova associação de digluconato de clorexidina e cloridrato de lidocaína em gel urogenital. Desenvolvimento farmacotécnico, avaliação da qualidade e da estabilidade da formulação”. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SILVA, Sílvia Gisela Almeida (2012) - “Desenho de experiências aplicado à produção de nanopartículas de PLGA para libertação controlada de Doxorubicina”. Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.

SOUSA, Fátima Aparecida Emm Faleiros (2002) - “Dor: O quinto sinal vital”. Revista Latino-americana de Enfermagem, 10(3): 446–447.

SUHONEN, T. Marjukka; BOUWSTRA, Joke A.; URTTI, Arto (1999) - “Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations”. Journal of Controlled Release, 59: 149–161.

UEDA, Clarence T.; SHAH, Vinod P.; DERDZINSKI, Kris; EWING, Gary; FLYNN, Gordon; MAIBACH, Howard; MARQUES, Margareth; RYTTING, Howard; SHAW, Steve; THAKKER, Kailas; YACOBI, Avi (2009) - “Topical and Transdermal Drug Products”. The United States Pharmacopeial Convention, 35(May-June): 750–764.

UNESP - “Análise de metais em amostras de interesse ambiental, biológico e/ou tecnológico”. Disponível na Internet: <http://www2.sorocaba.unesp.br/extensao/servicos/?p=1>. Consultado em 23 de agosto de 2013.

USP (2009a) - “Topical and transdermal drug products - Product performance tests”. The United States Pharmacopeial Convention, 35:May-June.

USP (2009b) - “Topical and transdermal drug products - Product quality tests”. Pharmacopeial Forum, 35:June.

WALTERS, Kenneth A. (2002) - "Dermatological and Transdermal Formulations". 10th edition. James Swarbrick. New York: Dekker, Marcel. ISBN: 0-8247-9889-9.

WELIN-BERGER, Katayoun (2001) - “Formulations, release and skin penetration of topical anesthetics”. Tese de Doutorado, Uppsala University.

ZACHAR, Carrie L. (2010) - "Pharmaceutically relevant microemulsions with potential topical, ophtalmic, and parenteral applications". Tese de Mestrado, University of Toledo. Disponível na Internet. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>. Consultado em 4 de março de 2013.

Anexos

Anexo I – Gráficos de Viscosidade _____ 84

Anexo II – Perfis de Libertação _____ 91

Anexo I – Gráficos de Viscosidade

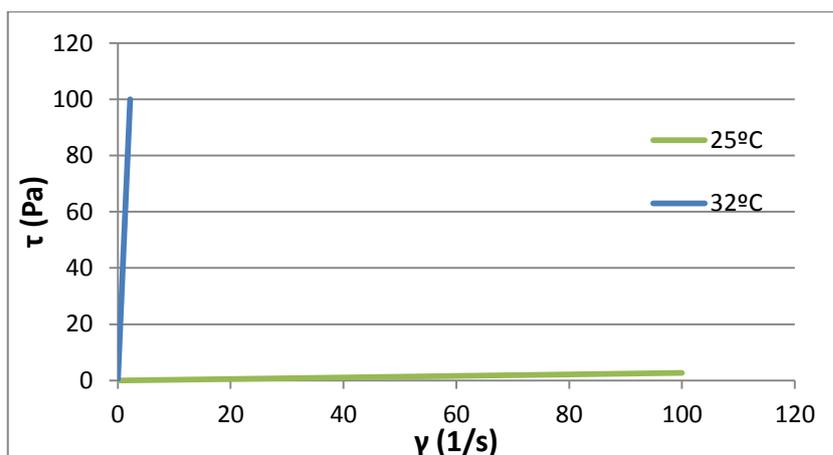


Gráfico 1: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ) para a formulação A1 analisada a duas temperaturas.

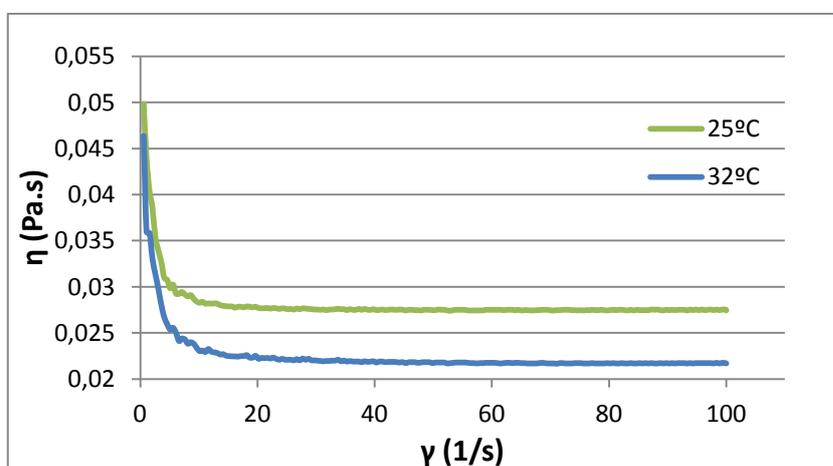


Gráfico 2: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ) para a formulação A1 analisada a duas temperaturas.

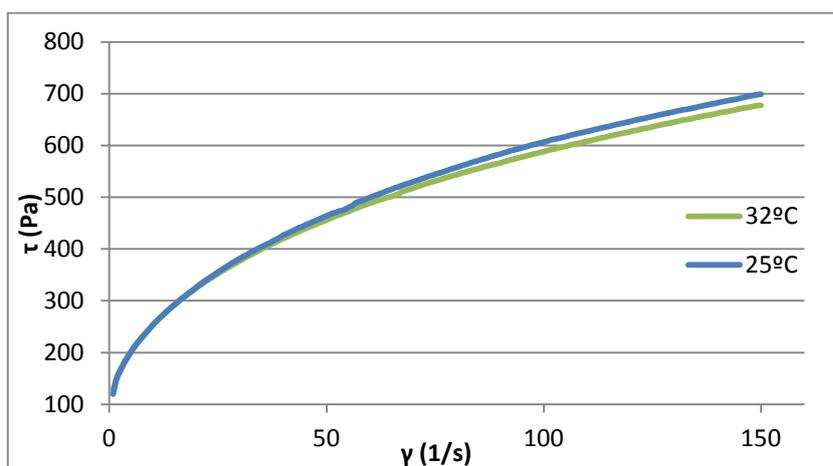


Gráfico 3: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ) para a formulação A3 analisada a duas temperaturas.

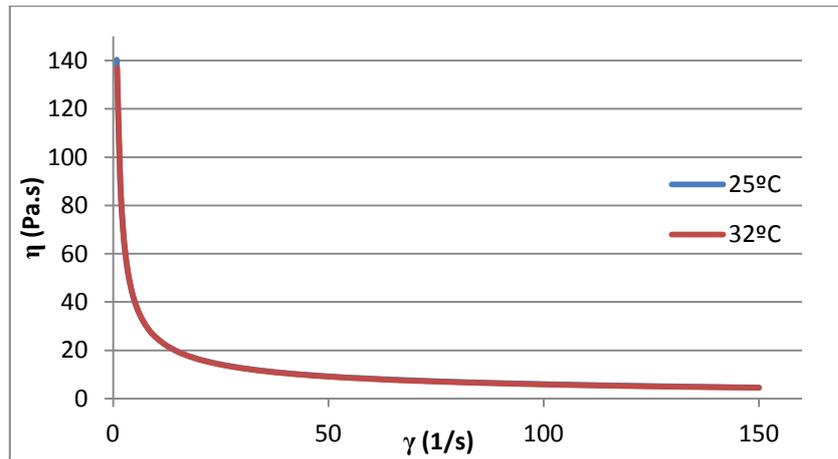


Gráfico 4: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ) para a formulação A3 analisada a duas temperaturas.

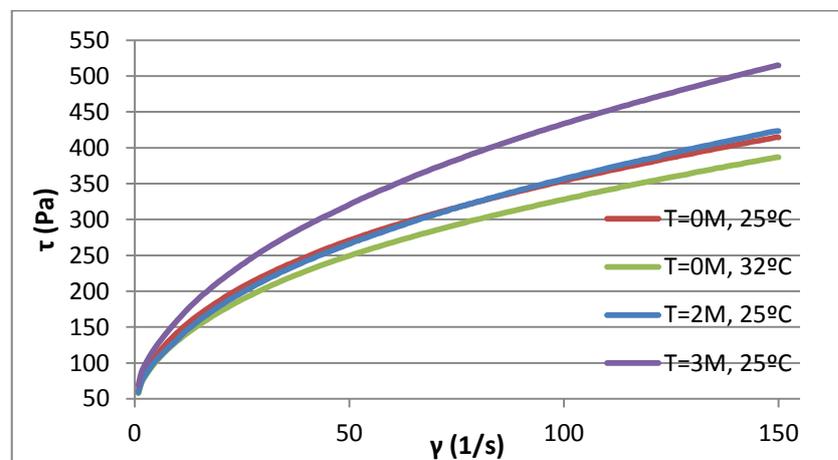


Gráfico 5: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ) para a formulação A3 com 2% de carbômero, armazenada a temperatura ambiente, analisada a duas temperaturas.

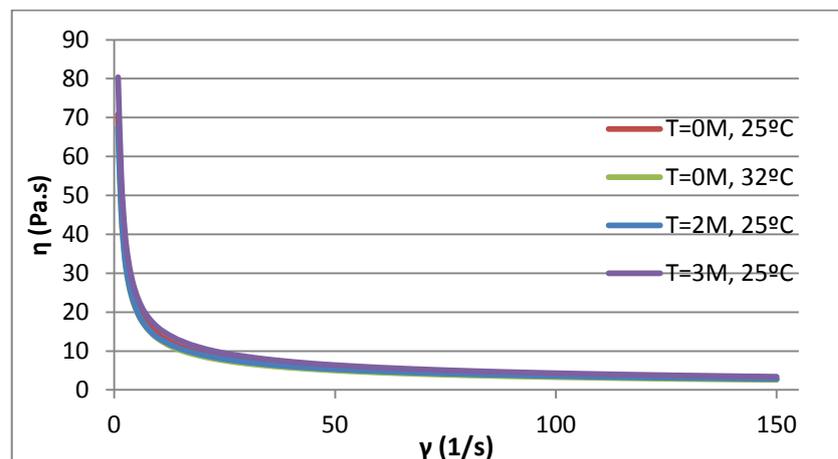


Gráfico 6: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ) para a formulação A3 com 2% de carbômero, armazenada a temperatura ambiente, analisada a duas temperaturas.

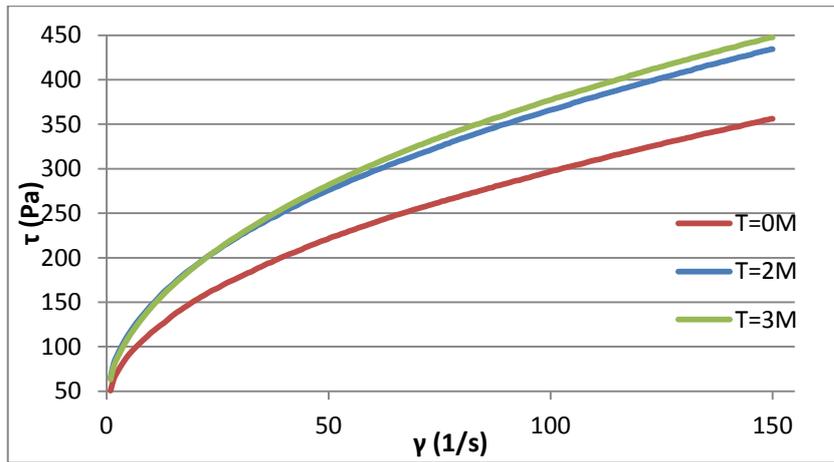


Gráfico 7: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ) para a formulação A3 com 2% de carbómero, armazenada a 5°C (análises a 25°C).

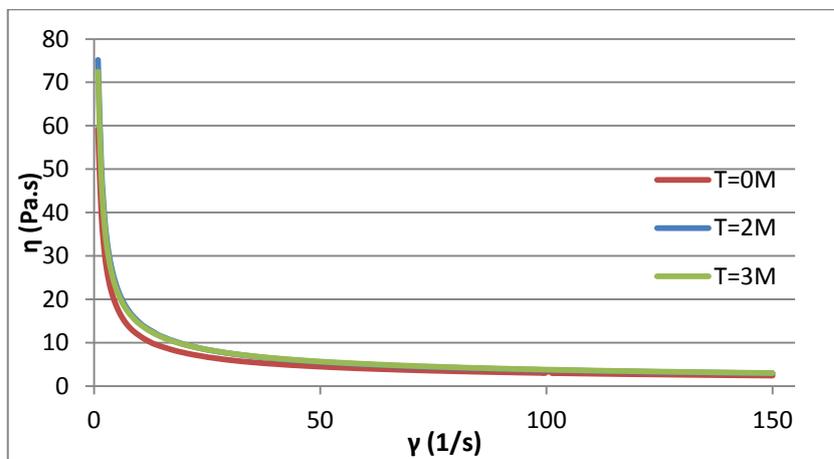


Gráfico 8: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ) para a formulação A3 com 2% de carbómero, armazenada a 5°C (análises a 25°C).

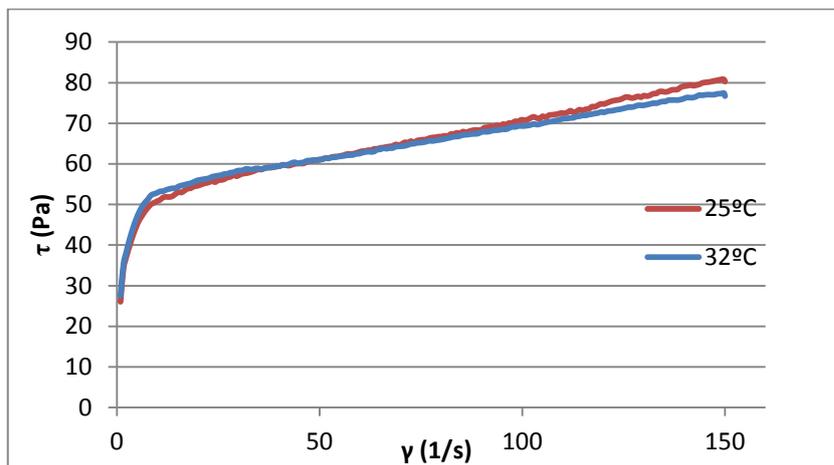


Gráfico 9: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ) para a formulação B analisada a duas temperaturas.

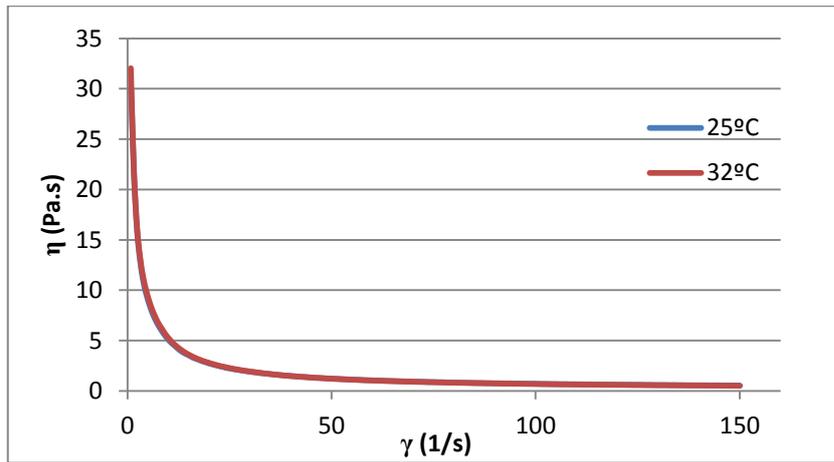


Gráfico 10: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ) para a formulação B analisada a duas temperaturas.

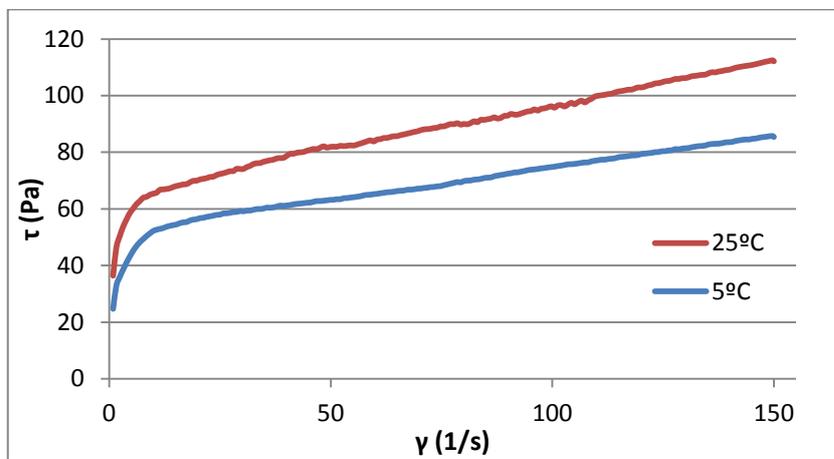


Gráfico 11: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ) para a formulação B armazenada em duas condições analisada a 25°C.

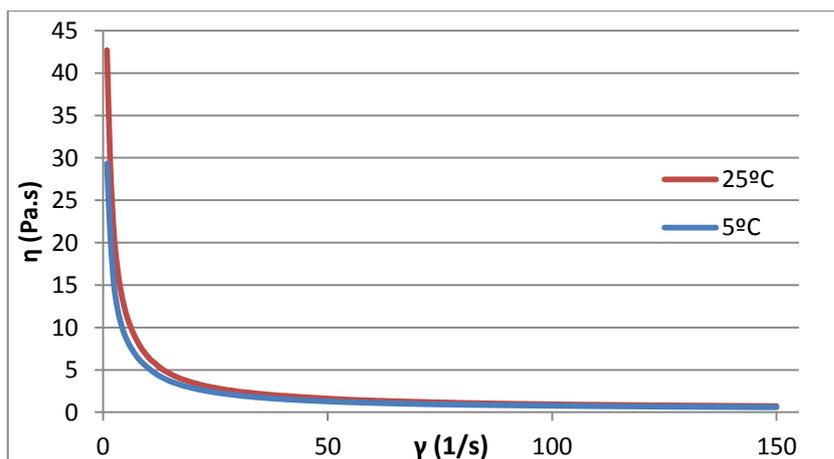


Gráfico 12: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ) para a formulação B armazenada em duas condições analisada a 25°C.

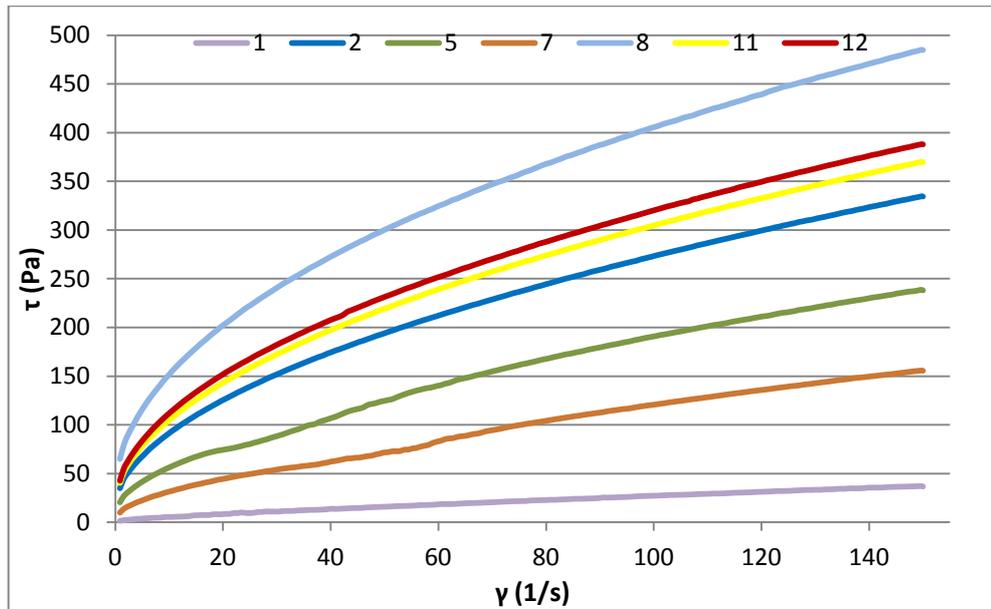


Gráfico 13: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ) para as formulações A do DoE com fármacos.

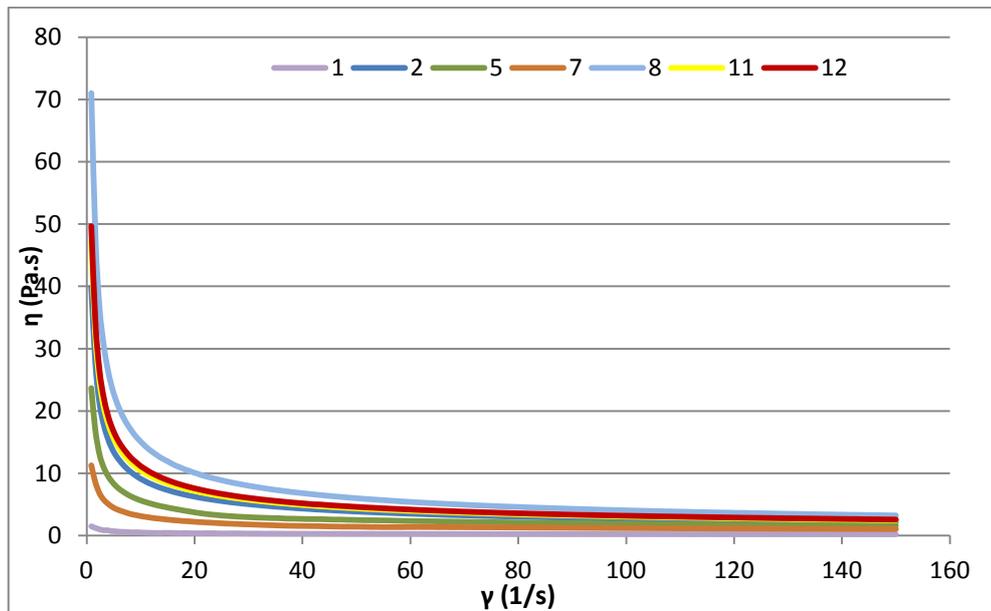


Gráfico 14: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ) para as formulações A do DoE com fármacos.

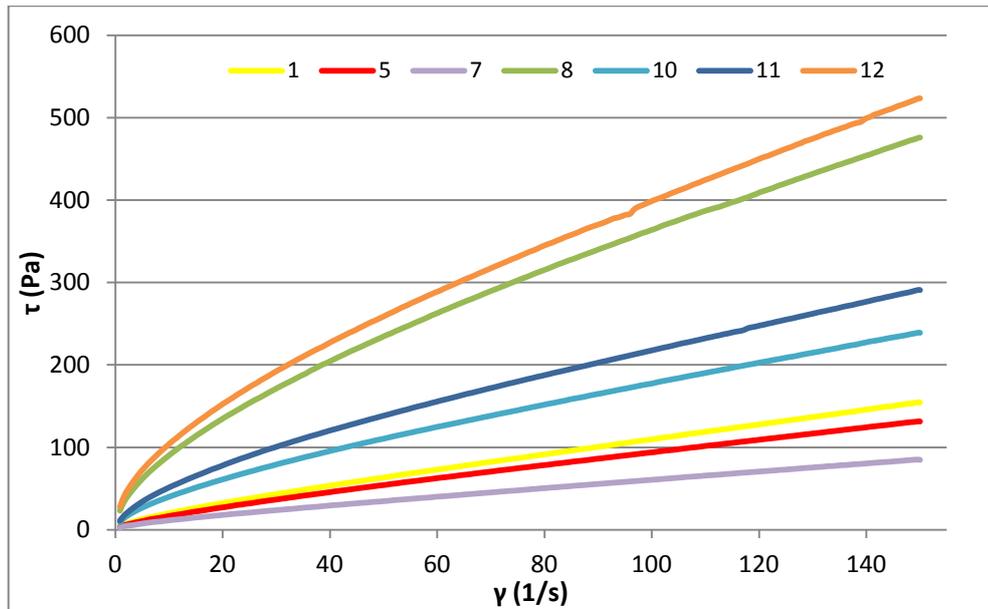


Gráfico 15: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ) para as formulações B do DoE com fármacos.

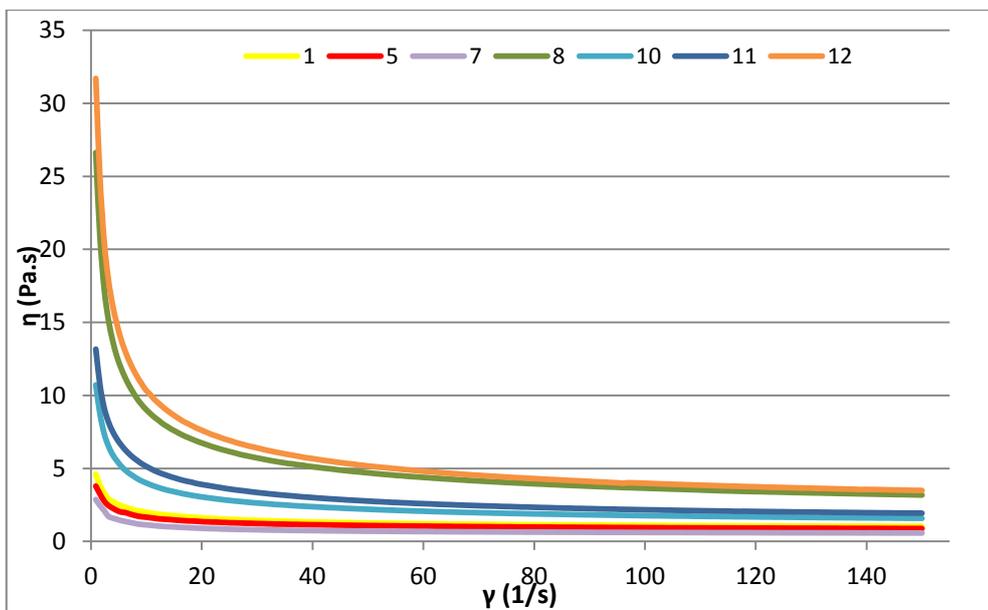


Gráfico 16: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ) para as formulações B do Doe com fármacos.

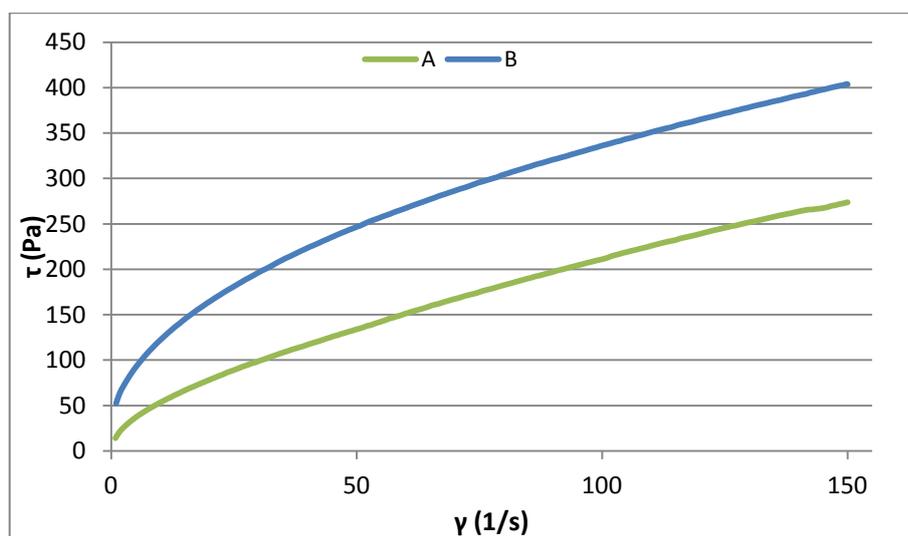


Gráfico 17: Variação da tensão de corte (τ) com o aumento da taxa de corte (γ) para as formulações ideais A e B.

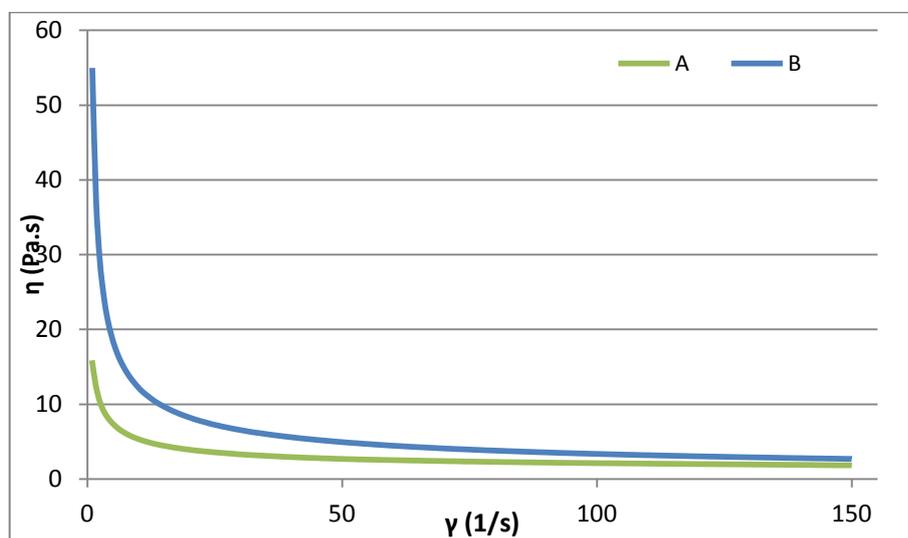


Gráfico 18: Variação da viscosidade (η) com taxa de corte (γ) para as formulações ideais A e B.

Anexo II- Perfis de Libertação

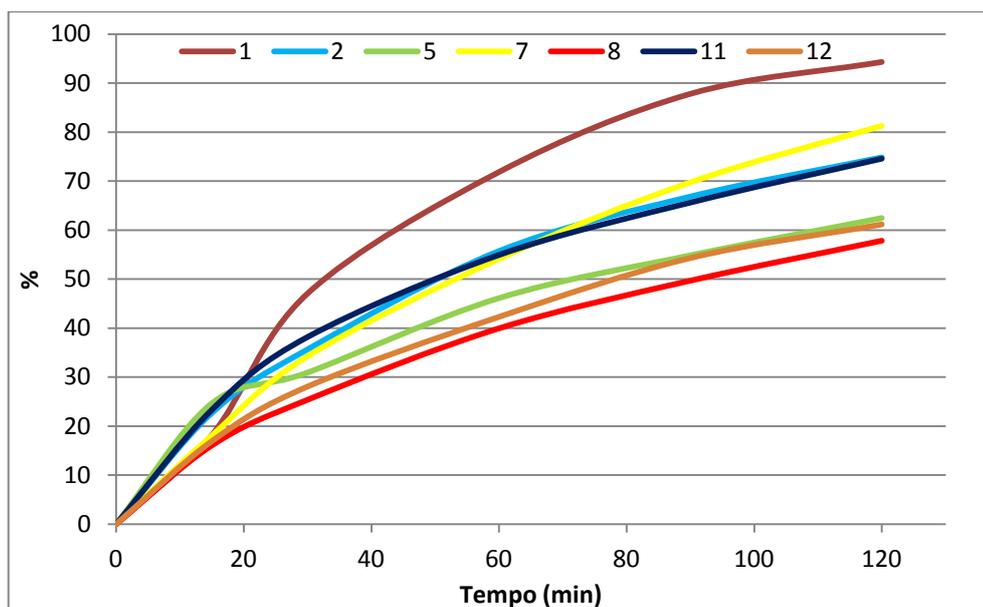


Gráfico 19: Perfil de liberação da lidocaína HCl para as formulações A do DoE.

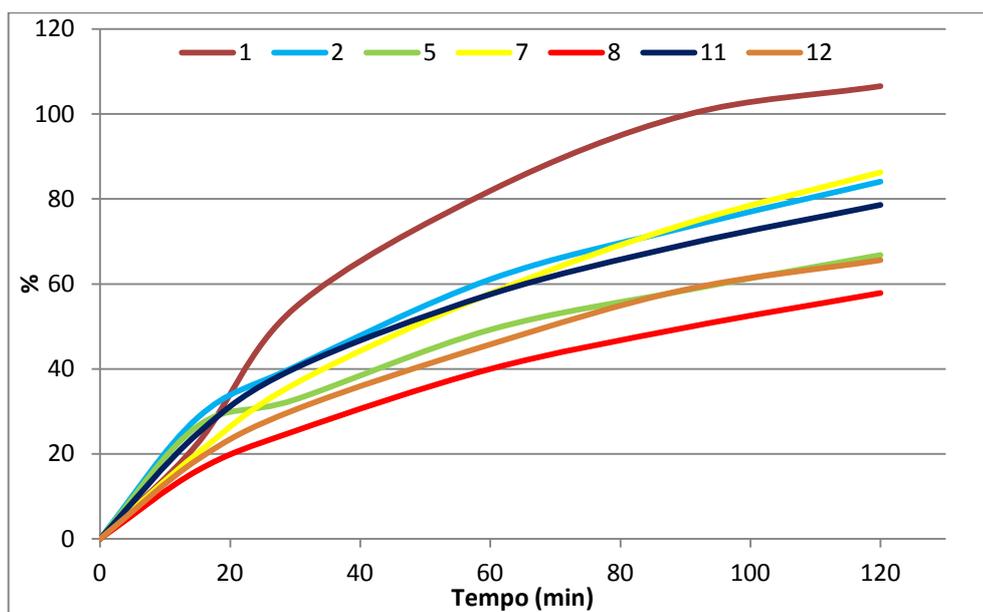


Gráfico 20: Perfil de liberação da prilocaína HCl para as formulações A do DoE.

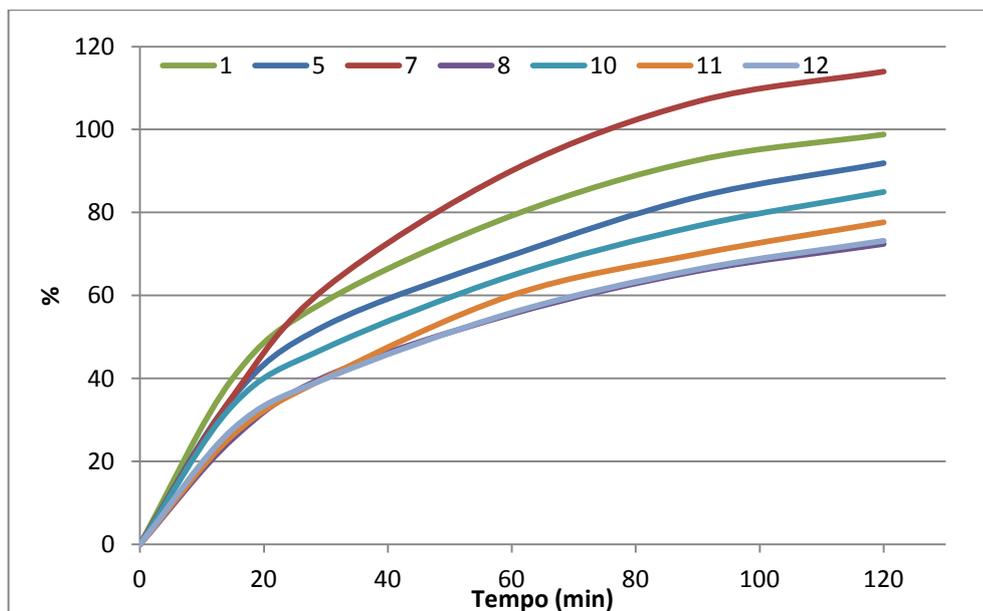


Gráfico 21: Perfil de libertação da lidocaína HCl para as formulações B do DoE.

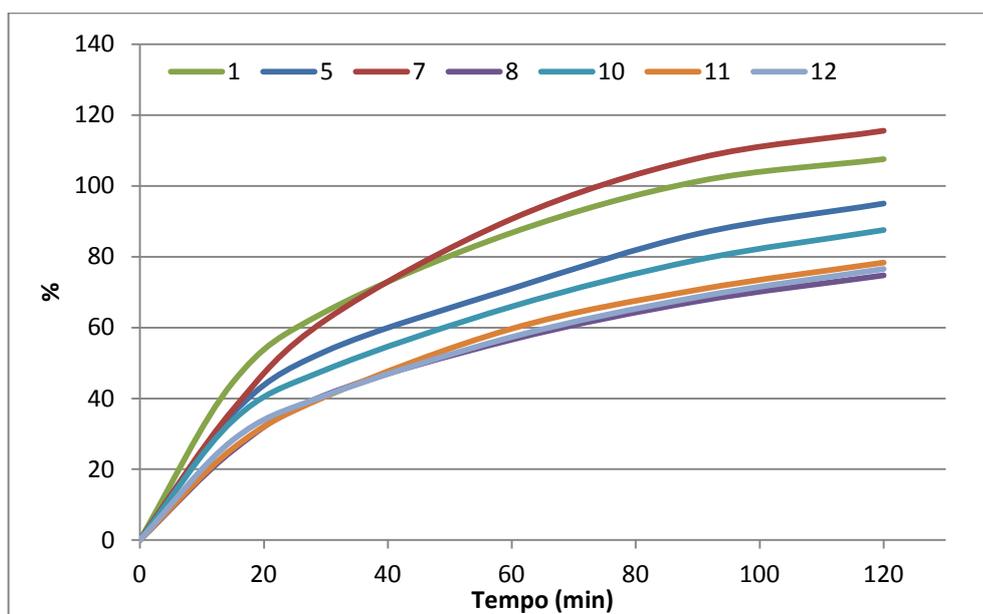


Gráfico 22: Perfil de libertação da prilocaína HCl para as formulações B do DoE.