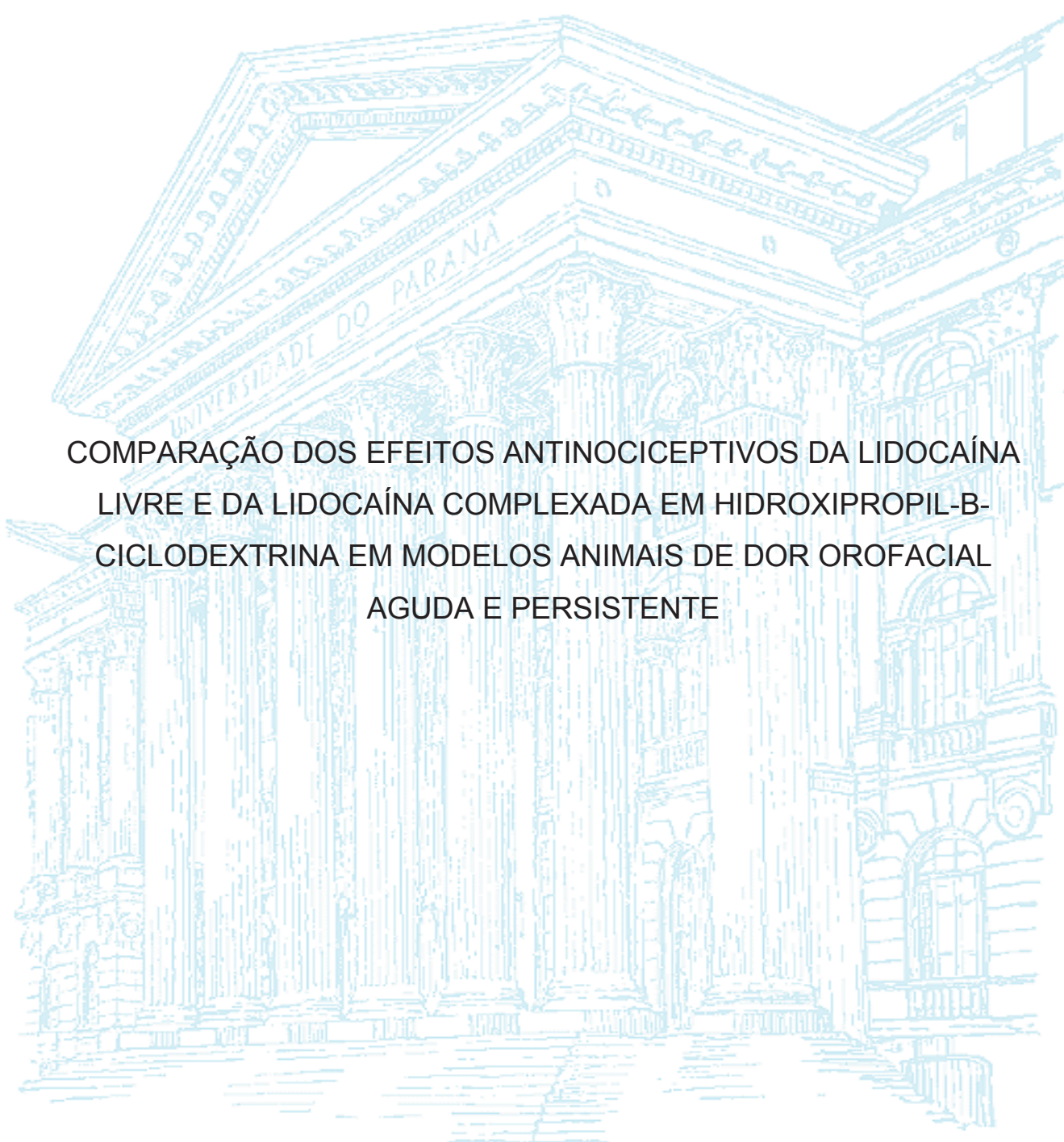


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STÉPHANI BATISTA DE OLIVEIRA



COMPARAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DA LIDOCAÍNA  
LIVRE E DA LIDOCAÍNA COMPLEXADA EM HIDROXIPROPIL-B-  
CICLODEXTRINA EM MODELOS ANIMAIS DE DOR OROFACIAL  
AGUDA E PERSISTENTE

CURITIBA

2018

STÉPHANI BATISTA DE OLIVEIRA

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DA LIDOCAÍNA  
LIVRE E DA LIDOCAÍNA COMPLEXADA EM HIDROXIPROPIL-B-  
CICLODEXTRINA EM MODELOS ANIMAIS DE DOR OROFACIAL  
AGUDA E PERSISTENTE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana  
Geremias Chichorro

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Rafaela Franco  
Claudino

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Oliveira, Stéphanie Batista de

Comparação dos efeitos antinociceptivos da lidocaína livre e da lidocaína complexada em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em modelos animais de dor orofacial aguda e persistente. / Stéphanie Batista de Oliveira. – Curitiba, 2018. 55 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Juliana Geremias Chichorro

Co-orientadora: Rafaela Franco Claudino

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Anestésicos. 2. Lidocaína. 3. Dor orofacial. I. Título. II. Chichorro, Juliana Geremias. IV. Claudino, Rafaela Franco. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.781



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA

### TERMO DE APROVAÇÃO

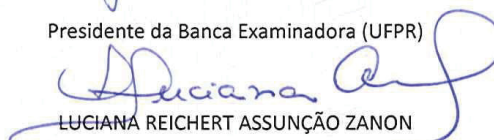
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **STEPHANI BATISTA DE OLIVEIRA** intitulada: **COMPARAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DA LIDOCAÍNA LIVRE E DA LIDOCAÍNA COMPLEXADA EM hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina EM MODELOS ANIMAIS DE DOR OROFACIAL AGUDA E PERSISTENTE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Maio de 2018.

  
JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
LUCIANA REICHERT ASSUNÇÃO ZANON

Avaliador Externo (UFPR)

  
EUNICE ANDRÉ

Avaliador Interno (UFPR)

*A minha mãe, que sempre me apoiou e  
incentivou a estudar, e me mostrou que o  
aprendizado é o caminho que nos leva até os  
sonhos. Obrigada pelo amor incondicional,  
carinho e cuidado, acima de tudo pelo seu  
colo.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Milda e Neusmari* pelo amor incondicional, paciência e por sempre me incentivarem e apoiarem na busca de meus sonhos. Por sempre demonstrarem confiança em mim e por se orgulharem das minhas conquistas.

A minha querida e amada irmã *Dayane*, por torcer por mim, conseguir me motivar, aguentar o mau humor e por sempre estar disposta a amenizar a tristeza com humor e carinho, além de ouvir os textos e dizer se faziam sentido.

A minha orientadora *Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Juliana Jeremias Chichorro*, por ter me acolhido desde o primeiro instante, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto. Obrigada pela orientação, paciência e respeitar os meus limites.

Aos meus amigos, por sempre entenderem minhas ausências e esquecimentos. Por realizarem convites de passeios mesmo sabendo que eu não iria. E por torcerem por mais essa etapa de vida, sempre com muito carinho.

Ao minhas queridas e especiais amigas do coração *Luciellen e Erelim*, por compreenderem os choros e reclamações de quão difícil é a vida acadêmica, por estarem na mesma situação. Obrigada pelo companheirismo, amizade, momentos de descontração e palavras incentivadoras.

Aos meus queridos *Olivia e Dominic*, fiéis companheiros e motivo de minha alegria ao voltar para a casa.

A minha querida colega *Ana Paula O. Batista*, pelos bons momentos de trabalho e descontração. Por todas as valiosas análises psicológicas e pela paciência nas crises existenciais.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, por aceitarem o convite e contribuírem com suas considerações ao aprimoramento deste trabalho e para minha progressão como pesquisadora.

Ao *Dr. Luiz E. N. Ferreira*, por toda colaboração e desenvolvimento do projeto, especialmente o fornecimento da medicação, além das preciosas explicações acerca do tema.

A toda equipe do laboratório da dor: *Erika, Eder, Rafaela, Jorya e Karin*, pelos ensinamentos, participação no trabalho, pela colaboração no dia a dia.

As colegas do departamento *Caroline Nagoseki e Ana Maria Raimundi*, que estiveram presente desde o dia da prova do mestrado e que compartilharam a jornada comigo, sempre com palavras de incentivo e aprendizado diário.

Aos professores, funcionários do Departamento de Farmacologia e equipe do biotério da UFPR, sempre solícitos e carinhosos.

A todos os antigos **professores e mestres**, por terem passado o bem mais precioso que é o conhecimento. Obrigada pelos momentos de aprendizado, riqueza de conteúdo e acolhimento que foram essenciais para meu desenvolvimento como pessoa e profissional.

A todos os animais, que ao darem suas vidas permitiram que esta pesquisa fosse realizada.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho e crescimento durante este período.

*“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe,  
pois, a sabedoria. Armazena sua vaidade para o amanhã”*

**LEONARDO DA VINCE**

## RESUMO

A lidocaína pertence à classe dos anestésicos locais, sendo empregada na clínica para realização de bloqueio nervoso e como droga antiarrítmica. Nos últimos anos, estudos evidenciam que a lidocaína pode ser utilizada no tratamento da dor, mas a ação terapêutica do fármaco é limitada por curta duração do seu efeito e toxicidade, quando empregada sistemicamente. Na tentativa de melhorar o desempenho dos anestésicos, a indústria farmacêutica tem manipulado suas propriedades farmacológicas através do uso de sistemas de liberação controlada. As evidências clínicas apontam que a associação dos fármacos com ciclodextrina, um tipo de carreador mais comumente utilizado, amplificou a eficácia anti-hiperalgésica dos anestésicos. Portanto, este estudo investigou qual formulação de lidocaína (livre ou complexada em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina) possuía melhor perfil analgésico *in vivo*, em modelos animais de dor orofacial aguda e persistente, e como a complexação em ciclodextrina modificava a liberação do anestésico *in vitro*. No ensaio de liberação controlada *in vitro*, a ciclodextrina ocasionou uma redução na liberação de lidocaína do compartimento doador ao longo do tempo avaliado quando comparado com a formulação livre. A injeção de formalina (2,5% em 50  $\mu$ L) no lábio superior induziu um aumento na resposta nociceptiva durante os primeiros três minutos (fase I) e de 12 a 30 minutos (fase II) após a injeção. Os tratamentos com ambas as formulações (2% em 50  $\mu$ L) aboliram a resposta da primeira fase e reduziram significativamente a segunda. A injeção de capsaicina (3  $\mu$ g/50  $\mu$ L, lábio superior) produziu hiperalgisia ao calor e foi significativamente reduzida pelo tratamento com as duas formulações de lidocaína (2% em 50  $\mu$ L). A hiperalgisia ao calor induzida por carragenina (100  $\mu$ g/50  $\mu$ L, lábio superior) foi observada entre 2 a 5 h. A lidocaína livre (LDC) e a lidocaína complexada (LDC:HP- $\beta$ -CD) foram administradas 150 min após a carragenina e apresentaram efeito anti-hiperalgésico significativo. A constrição do nervo infraorbital (CION), induziu hiperalgisia térmica e mecânica unilateral no 5º e 15º dia pós-cirurgia, respectivamente. O tratamento com LDC e LDC:HP- $\beta$ -CD (2% em 50  $\mu$ L, lábio superior) foi capaz de atenuar o comportamento hiperalgésico ao calor, porém o tratamento com LDC:HP- $\beta$ -CD apresentou efeito anti-hiperalgésico de maior magnitude e mais prolongado. Na hiperalgisia mecânica, as duas formulações de lidocaína (2% em 50  $\mu$ L, lábio superior) promoveram um aumento similar no limiar mecânico, que persistiu por 2 h após o tratamento. Estes resultados mostram que as duas formulações do anestésico local apresentaram efeito antinociceptivo em todos os modelos de dor utilizado. Porém, a LDC:HP- $\beta$ -CD apresentou melhor efeito, em termos de duração e magnitude, quando comparada com a formulação livre, corroborando estudos prévios que sugerem que a alteração das propriedades farmacológicas por meio de sistemas de liberação controlada promove uma droga com potencial promissor para o controle da dor.

**Palavras-chave:** anestésico local, carreador, formalina, capsaicina, carragenina, hiperalgisia, ciclodextrina, dor neuropática trigeminal.

## ABSTRACT

Lidocaine belongs to the class of local anesthetics, being used in the clinic for nerve block and as an antiarrhythmic drug. In recent years, studies have shown that lidocaine can be used in the treatment of pain, but the therapeutic action of the drug is limited by short duration of its effect, as well as toxicity, when administered systemically. In an attempt to improve the performance of anesthetics, the pharmaceutical industry has manipulated the pharmacological properties through the use of controlled release systems. Clinical evidence suggests that the association of drugs with cyclodextrin, the type of carrier most commonly used, amplifies the antihyperalgesic efficacy of anesthetics. Therefore, the present study investigated which formulation of lidocaine (free or complexed in hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) had a better analgesic profile *in vivo*, in animal models of acute and persistent orofacial pain, and how complexation in cyclodextrin modified the release of the anesthetic *in vitro*. In the *in vitro* controlled release assay, cyclodextrin caused a reduction in the release of lidocaine from the donor compartment over the assessed when compared to the free formulation. Injection of formalin (2.5% in 50  $\mu$ L) into the upper lip induced an increase in the nociceptive response during the first three minutes (phase I) and from 12 to 30 minutes (phase II) after the injection. Both formulations (2% in 50  $\mu$ L) abolished the first phase of the formalin-induced response and significantly reduced the second phase. Injection of capsaicin (3  $\mu$ g/50  $\mu$ L, upper lip) evoked heat hyperalgesia that persisted for 2 h, which was significantly reduced by both formulations of lidocaine (2%/50  $\mu$ L). Carrageenan-induced heat hyperalgesia (100  $\mu$ g/50  $\mu$ L, upper lip) was detected between 2 and 5 h. Free Lidocaine (LDC) and complexed lidocaine (LDC:HP- $\beta$ -CD) were injected 150 min after carrageenan and showed significant antihyperalgesic effect. Infraorbital nerve constriction (CION) induced thermal and mechanical hyperalgesia on postoperative day 5 and 15, respectively. LDC and LDC:HP- $\beta$ -CD (2% in 50  $\mu$ L, upper lip) was able to attenuate the heat hyperalgesia, while LDC:HP- $\beta$ -CD showed an anti-hyperalgesic of greater magnitude and more prolonged. In the mechanical hyperalgesia induced by CION, both formulations of lidocaine (2% in 50  $\mu$ L, upper lip) promoted a similar increase in the mechanical threshold, which persisted for 2 h after the treatment. These results suggest that both lidocaine formulations presented antinociceptive effect in all orofacial models evaluated. However, LDC:HP- $\beta$ -CD showed better effect in terms of duration and magnitude when compared to the free formulation, corroborating previous studies that suggest that the alteration of the pharmacological properties through controlled release systems promotes a drug with promising potential for pain control.

**Key words:** local anesthetic, carrier, formalin, capsaicin, carrageenan, hyperalgesia, cyclodextrin, trigeminal neuropathic pain.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Anestésico local
CB	Tampão Citrato, do inglês <i>CitrateBuffer</i>
CD	Ciclodextrina
CEUA	Comité de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CAP	Capsaicina
CAR	Carragenina
CYP	Citocromo P450
CION	Constricção do nervo infraorbital
EPM	Erro Padrão da Média
ION	Nervo infraorbital
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
HP- $\beta$ -CD	Hidroxipropil $\beta$ ciclodextrina
LDC	Lidocaína
NMDA	N-metil D-aspartato
Pka	Proteína quinase A
SNC	Sistema nervoso central
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide do tipo 1
VEÍC	Veículo

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - COMPONENTES DA ESTRUTURA DOS ANESTÉSICOS.....	11
FIGURA 2 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM .....	13
FIGURA 3 - CONCENTRAÇÃO SISTÊMICA X EFEITOS TÓXICOS DA LIDOCAÍNA NO ORGANISMO.....	15
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA CICLODEXTRINA .....	17
FIGURA 5 - SISTEMA TRANSDÉRMICO MANUAL .....	25
FIGURA 6 - ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	29
FIGURA 7 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA.....	31
FIGURA 8 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CAPSAICINA.....	32
FIGURA 9 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR CARRAGENINA .....	33
FIGURA 10 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA INDUZIDA POR CION .....	35

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 ANESTÉSICOS LOCAIS .....	10
1.1.1. Mecanismo de ação dos anestésicos locais.....	12
1.2 LIDOCAÍNA.....	13
1.3 CICLODEXTRINAS .....	16
1.3.1. Anestésicos locais associados a sistema de liberação controlado.....	18
1.4 DOR OROFACIAL .....	19
1.5 DOR OROFACIAL X QUALIDADE DE VIDA.....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 MATERIAL .....	23
3.1.1 Animais.....	23
3.1.2 Drogas e soluções.....	23
3.1.3 Preparação da lidocaína complexada com HP- $\beta$ -CD (LDC:HP- $\beta$ -CD) .....	24
3.2 MÉTODOS.....	24
3.2.1 Ensaio e determinação da cinética de liberação <i>in vitro</i> .....	24
3.2.2 Teste da formalina orofacial .....	26
3.2.3 Construção do Nervo Infraorbital (CION).....	26
3.2.4 Avaliação da Hiperalgisia Térmica ao Calor.....	27
3.2.5 Avaliação da Hiperalgisia Mecânica.....	27
3.2.6 Procedimentos experimentais .....	28
3.2.7 Análise estatística .....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	29
4.2 EFEITO COMPARATIVO DA LDC E LDC:HP- B-CD NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL .....	30
4.3 EFEITO COMPARATIVO DA LDC E LDC:HP-B-CD NA HIPERALGESIA OROFACIAL AO CALOR INDUZIDA POR CAPSAICINA.....	32

4.4 EFEITO COMPARATIVO DA LDC E LDC:HP-B-CD NA HIPERALGESIA OROFACIAL AO CALOR INDUZIDA POR CARRAGENINA .....	33
4.5 EFEITO COMPARATIVO DA LDC E LDC:HP-B-CD NA HIPERALGESIA OROFACIAL TÉRMICA E MECÂNICA INDUZIDA POR CION.....	34
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ANESTÉSICOS LOCAIS

A cocaína foi a primeira substância com propriedade anestésica conhecida da história, proveniente das folhas do arbusto coca (*Erythroxylon coca*), a qual foi isolada em 1856 por Albert Niemann. Em 1886, Carl Koller utilizou a cocaína como anestésico oftalmológico, mas devido às suas propriedades aditivas e toxicidade foi descontinuada das práticas clínicas (BERK et al., 2018).

Assim, surgiu a necessidade de alternativas farmacológicas para a realização do bloqueio nervoso. Em 1900 há relatos da primeira preparação de Benzocaína, em 1905 foi desenvolvida a Procaína e, em 1943 foi sintetizada a Lidocaína. Esses fármacos foram desenvolvidos para atuar como bloqueadores da condução nervosa e para serem empregados como anestésicos em procedimentos cirúrgicos. Entretanto, essa classe de fármacos apresenta efeitos que limitam o seu uso satisfatório, tais como toxicidade e curta duração do bloqueio nervoso, o que fundamenta a busca por novos fármacos e/ou formulações mais eficientes (RUETSCH et al., 2001).

A classe dos anestésicos locais (AL) é composta por uma variedade de drogas, que inibem a percepção sensorial. Esses fármacos possuem diferenças em sua estrutura molecular, principalmente na conformação das cadeias de ligação (amida ou éster) e posição dos aminoácidos que fazem as ligações (FRACETO et al., 2008; RUETSCH et al., 2001).

A estrutura molecular dos ALs consiste em três componentes básicos, representados na figura 1, sendo que cada componente contribui para a propriedade farmacológica da droga. Existe um anel aromático lipofílico que contribui para a solubilidade do fármaco, influenciando a entrada do anestésico nas bainhas nervosas e nas membranas do axônio. Essa estrutura é unida a uma cadeia intermediária de ligação que pode ser do tipo amida ou éster. A cadeia intermediária é o fator que influencia o processo de metabolismo do fármaco, potência e velocidade de início da ação. A terceira parte da estrutura é formada pelo grupamento amina, o qual confere a solubilidade da droga em água (BECKER e REED, 2012).

Cada AL possui uma característica farmacológica que é determinada pelas propriedades físico-químicas, como o grau de ligação às proteínas plasmáticas, pka e

lipossolubilidade, e também, são diferenciados pelo tempo que perdura o bloqueio nervoso, potência e toxicidade no organismo (DE PAULA e SCHREIER, 1996; NAU e WANG, 2004).

Os anestésicos do tipo amida são os mais utilizados na clínica, pois possuem melhor lipossolubilidade, potência e duração de efeito e apresentam propriedades alérgicas menores que os anestésicos locais do tipo éster (SAMBROOK e GOSS, 2011; RUETSCH et al, 2001).

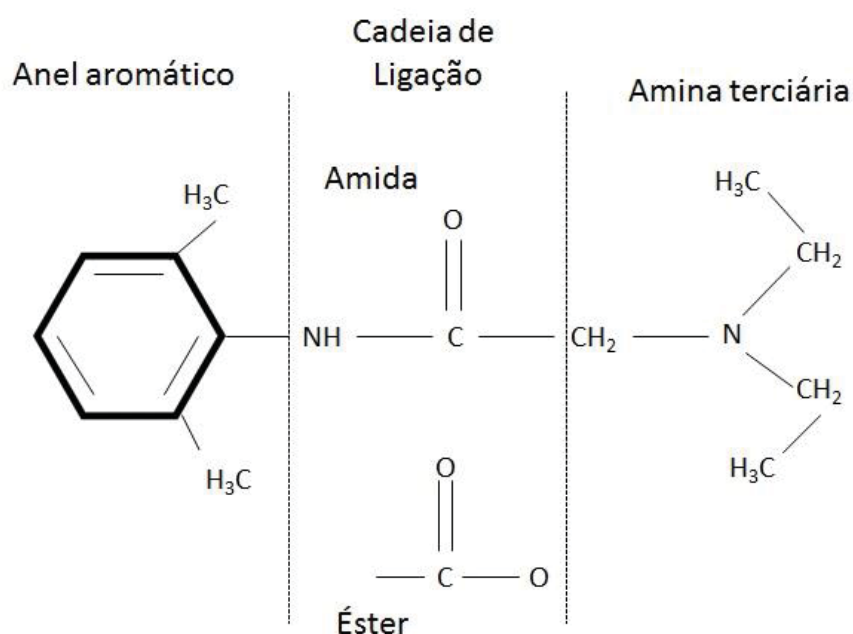


FIGURA 1 –COMPONENTES DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS (1) Anel aromático, (2) cadeia intermediária, (3) ligação terciária amina. Cada componente da estrutura contribui para as propriedades químicas e clínicas da molécula.

Os ALs são empregados na clínica como bloqueadores reversíveis temporários da condução nervosa. O uso destas drogas ocorre principalmente em procedimentos cirúrgicos, e especialmente na área da odontologia, para realização de procedimentos clínicos. Estes requerem início de efeito rápido e um tempo de duração do bloqueio que permita a realização da maioria dos tratamentos dentários (RUETSCH et al, 2001; SAMBROOK e GOSS, 2011;). O bloqueio nervoso ocorre de forma progressiva, sendo determinado pelo calibre das fibras nervosas alcançadas e concentração de fármaco no local. A ordem em que ocorre a inibição da atividade sensorial é a perda da sensibilidade de dor, temperatura, toque e por último a função motora (CASSUTO et al., 2006; HOLLMANN e DURIEUX, 2000; SAMBROOK e GOSS, 2011).

### 1.1.1 Mecanismo de ação dos anestésicos locais

O alvo clássico dos anestésicos locais são os canais de sódio dependentes de voltagem, os quais consistem em uma proteína transmembrana formada por quatro domínios homólogos, representados na figura 2. Cada um destes domínios possui seis segmentos (S1 a S6)  $\alpha$  hélice organizados de modo a formar um poro no centro. Cada subunidade possui aminoácidos (arginina) carregados positivamente concentrados na porção S4, que formam a região de disparo do canal. Quando ocorre a depolarização da membrana, as cargas positivas sofrem uma rotação interna e deixam as cargas negativas não pareadas no interior da membrana, modificando a conformação dos domínios de modo a iniciar o processo de abertura (ativação) do canal. O domínio III e IV do canal possui um laço intracelular curto ligando-os, que após um milissegundo de abertura do canal, realiza a oclusão do poro, iniciando o estado de inativação. Já o segmento S6 funciona como local de ligação dos fármacos que atuam no canal, como anestésicos, antiarrítmicos e anticonvulsivantes (DONG et al., 2014; ISOM, 2001).

Os canais de sódio dependentes de voltagem são encontrados em três estados diferentes de conformação: fechado, aberto e inativo. Inicialmente encontram-se fechados, e após a despolarização da membrana ocorre à abertura do poro permitindo o influxo dos íons de sódio tornando-os ativos. Cerca de um milissegundo após a abertura, a ligadura presente nos domínios III e IV dobra-se e bloqueia o poro, impedindo a passagem dos íons e inativando o canal. No período inativo, o canal de sódio não é passivo de funcionalidade, ou seja, mesmo que uma nova despolarização seja deflagrada, ela não resultará em abertura do poro. A passagem do estado inativado para o estado de repouso (i.e. passível de abertura) chama-se período refratário (DONG et al., 2014; ISOM, 2001; LONG et al, 2005). A afinidade dos ALs pelo canal é maior quando este se encontra inativo, portanto, o grau de bloqueio vai variar conforme a conformação do canal (BECKER e REED, 2012; SOUZA, 2013).

Os canais de sódio dependentes de voltagem são responsáveis pela iniciação e propagação do potencial de ação em células excitáveis, incluindo células nervosas, musculares e neuroendócrinas (HILLE, 2001; ISOM, 2001).

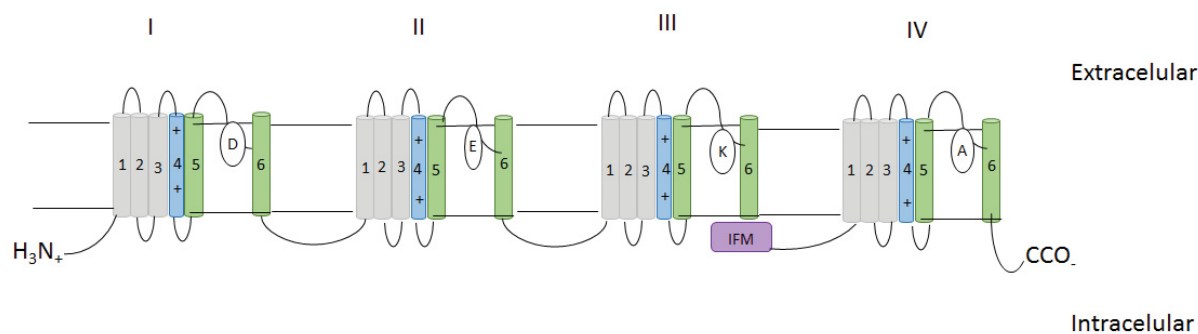


FIGURA 2 - ESTRUTURA MOLECULAR DO CANAL DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTE. Caracteriza-se pela presença de 4 domínios transmembranares homólogos, cada domínio possui seis segmentos transmembranares  $\alpha$  hélice S1 a S6, que se organizam de modo a formar um poro ao centro. Os segmentos S4 em cada domínio contêm resíduos de aminoácidos carregados positivamente (geralmente arginina) em cada terceira posição. Esses resíduos servem como cargas de passagem e se movem através da membrana para iniciar a ativação do canal em resposta à despolarização. O laço intracelular curto ligando os domínios III e IV homólogos serve como porta de inativação, dobrando-se na estrutura do canal e bloqueando o poro a partir do interior durante a despolarização sustentada da membrana. No domínio IV no S6 está situado o local de ligação para anestésicos locais e drogas anti-epilépticas e anti-arrítmicas. Modelo proposto por DONG et al., 2014.

Os anestésicos locais ao se ligarem na porção S6 do canal o estabilizam em seu estado inativo, impedindo, portanto, a geração do potencial de ação de células nervosas, de modo a interromper a condução do estímulo nervoso promovendo a anestesia. Considerando que o sítio de ligação do ALs é intracelular, para promover seu efeito as moléculas da droga precisam se difundir pela membrana da célula nervosa. A difusão é facilitada quando o fármaco se encontra no estado não ionizado, e por se tratarem de bases fracas, sua ação sofrerá forte influência do pH do meio (BUTTERWORTH e STRICHARTZ, 1990; COURTNEY e STRICHARTZ, 1987; HILLE, 2001; ISOM, 2001; STRICHARTZ e RITCHIE, 1987;). Por isso, em tecidos lesionados, especialmente em casos que exista inflamação a ação dos anestésicos é dificultada (BECKER e REDD, 2012).

## 1.2 LIDOCAÍNA

A lidocaína (LDC) é um anestésico do tipo amida que foi sintetizado pela primeira vez em 1943 por NilsLöfgren (MOISES, 2008; ORLANDO et al., 2004; RUETSCH et al, 2001;). Seu uso na clínica foi implementado em 1948, para a realização de infiltração anestésica através do bloqueio nervoso regional, posteriormente devido ao seu mecanismo de ação, foi empregada também como droga antiarrítmica (MOISES, 2008). Destaca-se que a lidocaína é o fármaco de

escolha na prática clínica, devido aos seus aspectos farmacocinéticos e bom perfil de segurança quando comparado a outros ALs. Por essas razões, que o uso da lidocaína foi amplamente disseminado em ambulatórios, especialmente na odontologia (FERREIRA, 2014; MOISES, 2008; YOU et al., 2017).

O início da ação é rápido, em torno de 2 a 3 minutos após ser administrado, e o bloqueio nervoso produzido pode perdurar por 1 a 1 ½ hora sem o uso de vasoconstritor, ou de 2 a 4 horas quando associado a um vasoconstritor (BECKER e REED, 2012; SILVA, 2009).

Esse anestésico pode ser encontrado em diversas apresentações, tais como creme, solução, colírio, e permite administração por diversas vias inclusive tópica, peridural, intramuscular, subcutânea e endovenosa. O método por qual ela vai ser aplicada interfere na sua taxa de absorção e em sua biodisponibilidade (MOISÉS, 2008; SILVA, 2009).

A lidocaína distribui-se no organismo ligada a proteínas plasmáticas, sendo que em média a fração de ligação fica em torno de 60 a 80% do total da droga no organismo (ORLANDO et al., 2004). Por ser uma base fraca com (pKa 7,7), em pH fisiológico (i.e 7.4), cerca de 50% da proporção das moléculas do AL no organismo será encontrada na forma ionizada, isto é, aptas para atravessar as membranas neuronais e dos axônios (BECKER e REED, 2012; ORLANDO et al., 2004; SILVA, 2009). Especialmente em meios com pH ácido, a proporção de moléculas na forma ionizada aumenta, isso explica o fato de que a realização de bloqueio nervoso em tecidos inflamados é dificultada (BECKER e REED, 2012).

A LDC é metabolizada no fígado pelas enzimas CYP3A4 e CYP1A2, onde é convertida por oxidação à monoetilglicinaxilidida, e uma parte hidrolisada à glicinaxilidida, para ser eliminada (SILVA, 2009). Os casos de toxicidade do fármaco no organismo (conforme esquema representados na figura 3), são dependentes da concentração plasmática, velocidade em que ocorre o aumento da concentração, bem como, velocidade de remoção do fármaco da corrente sanguínea através dos processos de biotransformação. Especialmente, nos casos em que os pacientes recebem doses repetidas por meio de infusão endovenosa contínua, já que a dose máxima de segurança recomendada da LDC é 200 a 500 mg/dia (OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS, 2012; WANG et al., 2000;).

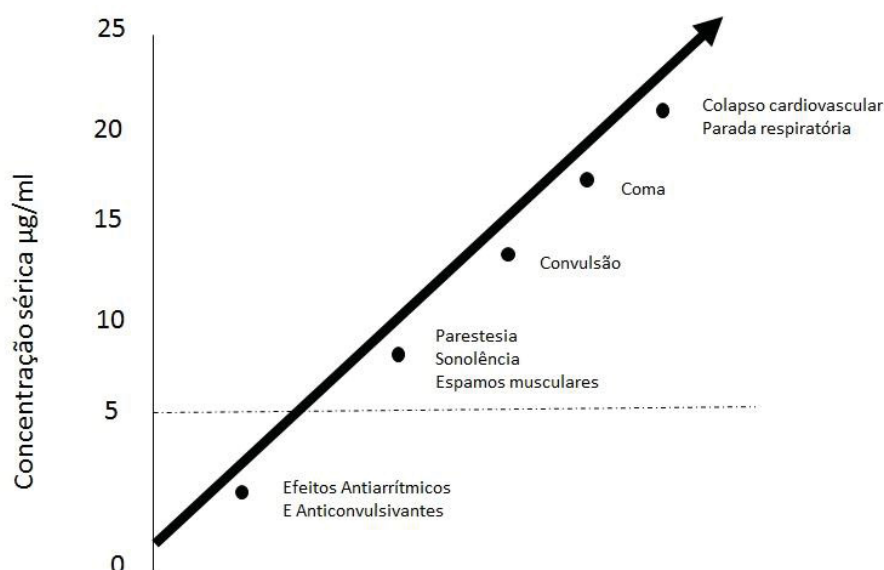


FIGURA 3 – CONCENTRAÇÃO SISTÊMICA X EFEITOS TÓXICOS DA LIDOCAÍNA NO ORGANISMO. Até a concentração de 5 µg/ml no soro a lidocaína possui propriedades terapêuticas, acima dessas concentrações, os efeitos tóxicos aparecem, e vão desde parestesia até colapso cardiovascular. Adaptado de BECKER e REED, 2012.

Além do uso da LDC para realização de anestesia e como droga antiarrítmica, pesquisas realizadas na área da farmacologia nos últimos anos, apontam a droga como uma alternativa terapêutica para o manejo da dor. Estudos utilizando a aplicação de lidocaína por via tópica em condições dolorosas orofaciais, especialmente em pacientes idosos e em situações em que medicações sistêmicas são contraindicadas têm apresentado resultados promissores (NASRI-HEIR et al., 2013).

Em relação à utilização da lidocaína na apresentação de emplastos para tratamento de neuralgia pós-herpética e neuralgia do trigêmeo, as evidências clínicas apontam bom perfil de segurança e resultados eficazes (KANAI et al., 2009; NIKI et al., 2014) Em outros estudos, usando o bloqueio nervoso periférico com lidocaína, os resultados apresentam a redução da intensidade, frequência e duração dos ataques de dor em pacientes com diferentes tipos de cefaleias e neuralgias de nervos cranianos (DACH et al, 2015). Em adição, a lidocaína incorporada em adesivos cutâneos também tem sido empregada no tratamento da dor orofacial neuropática periférica promovendo melhora do quadro clínico (CASALE et al., 2014; KERN et al., 2013, KHAWAJA et al., 2013).

Apesar dos resultados promissores de estudos na clínica empregando a LDC como terapia alternativa para manejo da dor por diversas vias, existem fatores que limitam a ação do fármaco no organismo (ANIRUDHAN, et al., 2016). Os problemas

encontrados são comuns da classe dos ALs: dificuldade em transpor barreiras fisiológicas, duração da analgesia que é relativamente curta (2 a 4 horas), rápida dispersão do local de injeção e toxicidade local e sistêmica (GRANT, 2002; MCLURE e RUBIN, 2005).

### 1.3 CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) são macromoléculas com peso entre 1000 a 2000 daltons, provenientes da degradação do amido por meio da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase, as quais foram descobertas em 1891 por Villiers (VENTURINI et al., 2008). A ligação 1,4 de  $\alpha$ -D-glicopirranose forma um composto cônico (figura 4), que possui uma superfície relativamente hidrofílica e cavidade central mais hidrofóbica, onde as moléculas de substâncias químicas se inserem para formar um complexo (CARVALHO, 2014; DOLLO et al., 2000; LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007;)

Desde sua descoberta, as CDs têm despertado o interesse da comunidade científica, em relação a sua aplicabilidade na prática e modificação de sua estrutura de modo a amplificar seu uso em diferentes áreas. Desde a década de 80, esses oligossacarídeos têm sido utilizados na área industrial, como uma alternativa para manipular as características químicas de diversas substâncias, deixando-as mais hidrossolúveis, aumentando sua biodisponibilidade, bem como reduzindo sua toxicidade (CARVALHO, 2014; VENTURINI et al., 2008). As áreas que mais utilizam as CDs são a alimentícia e farmacêutica, onde a acoplação de moléculas acarreta em complexos altamente estáveis que podem ser utilizados por seres humanos (DE JESUS et al., 2006).

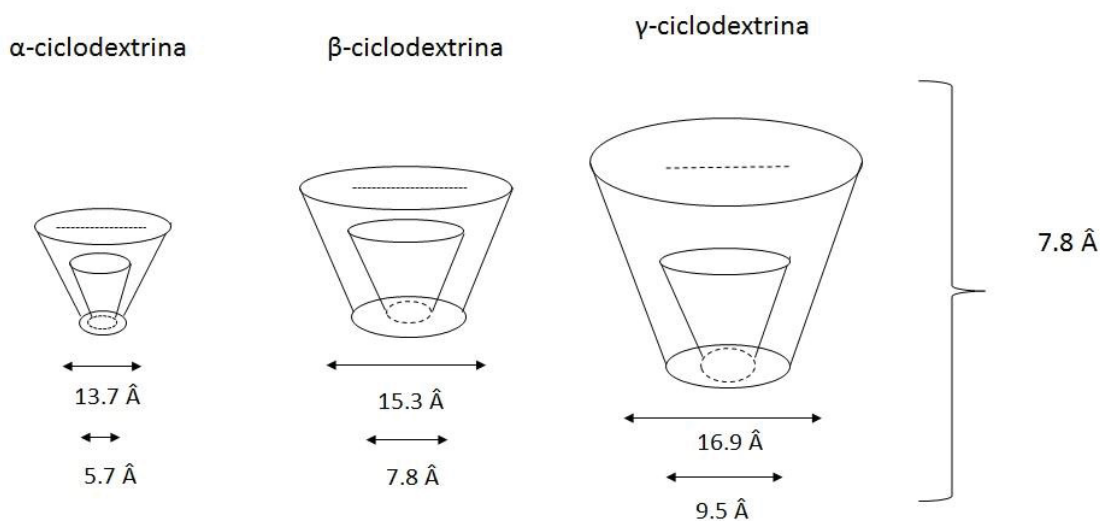


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA CICLODEXTRINA. Esquema representa os três tipos de ciclodextrina: α-CD, β-CD, γ-CD com sua conformação cônica e suas respectivas dimensões. Adaptado de CARVALHO, 2014.

Diversas conformações de CDs são encontradas, sendo que as diferenças entre os subtipos α, β e γ é a quantidade de unidades da cadeia de α-D-glicopiranosose em sua composição, podendo ser 6, 7 ou 8, respectivamente (CARVALHO, 2014; FERREIRA, 2014). Porém, um fator que dificulta o uso disseminado destes compostos é o tamanho da cavidade e solubilidade, sendo esse último resolvido com a modificação dos grupos hidroxílicos na estrutura natural da CD (HEDGES, 1998).

A β-ciclodextrina é a formulação mais utilizada, devido à sua acessibilidade e preço mais baixo em um grande número de setores, tais como, têxtil, agrícola e farmacêutico (VENTURINI et al., 2008). Neste último, é usada como excipiente, intensificador de fragrância e modificador de sabor para disfarçar características indesejáveis do princípio ativo. Além disso, sua ampla utilização se baseia nas características químicas combinadas de ser solúvel em água com grupos hidroxila expostos e, ao mesmo tempo, carrear compostos hidrofóbicos em sua estrutura interna (KURKOV E LOFTOSSON, 2013; RASHEED et al., 2008; UEKAMA et al., 1998).

Modificações realizadas na estrutura da β-ciclodextrina permitiram novos avanços na área farmacêutica, que possibilitaram realizar a complexação da CD com fármacos para serem administrados por diversas vias (BIBBY et al., 2000). Todavia, o uso de ciclodextrina para carrear drogas ainda é um processo recente, que teve início em meados da década de 80 (VENTURINI et al., 2008). Por essa razão, nem todos

os mecanismos desse sistema de liberação estão esclarecidos. Porém, os resultados obtidos até o momento são bastante promissores, e indicam a capacidade de reduzir a velocidade de hidrólise de antibióticos por enzimas de degradação, liberação de fármacos em tecidos específicos, redução da toxicidade sistêmica e distribuição uniforme do fármaco pelos tecidos (DE JESUS et al., 2006; VENTURINI et al., 2008).

### 1.3.1 Anestésicos locais associados a sistemas de liberação controlado

O padrão desejável para uma droga anestésica seria possuir tempo de ação suficiente para a execução de procedimentos sem requerer uma nova aplicação de dose, aumento da seletividade para o bloqueio sensorial em relação ao bloqueio motor e diminuição da toxicidade local e sistêmica (BIBBY et al., 2000; FERREIRA, 2014). Assim, na busca de uma analgesia prolongada, diversos sistemas de liberação sustentada de fármacos têm sido empregados, principalmente a nanotecnologia e a encapsulação dos fármacos em lipossomas ou carreadores, como as ciclodextrinas (JONG, 1994 apud in MORAES et al., 2007).

O uso de sistemas de liberação controlada permite a manipulação das características da molécula dos ALs. Neste sentido, alguns benefícios do emprego destes sistemas já foram demonstrados, tais como tempo de ação prolongado, aumento da disponibilidade na área interfacial dos tecidos biológicos, o que resultou em maior eficácia analgésica (DE PAULA et al., 2010; SHIKANOV et al., 2007; SUZUKI et al., 2009).

Estudos realizados por Mashimo em 1992, Bucalo em 1998 e Grant et al., 2004, utilizando lidocaína acoplada em lipossomas, evidenciaram um aumento do efeito anestésico e diminuição da dor nas regiões que receberam a aplicação da formulação complexada (FERREIRA, 2014).

Evidências de estudos pré-clínicos apontam que a lidocaína complexada com a ciclodextrina, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, melhorou a viabilidade celular em queratinócitos humanos e fibroblastos gengivais e prolongou o bloqueio do nervo ciático em ratos, respectivamente (GOULD e SCOTT, 2005; SUZUKI et al., 2009). Ademais, outros estudos têm demonstrado que a complexação de diferentes anestésicos locais, tais como benzocaína, bupivacaína, ropivacaína, e prilocaína, em

ciclodextrina aumentaram a duração e a intensidade do bloqueio nervoso (ANIRUDHAN et al., 2016; CERADA et al. 2006; SERPE et al., 2014).

Outro fator positivo do uso combinado de CDs e anestésicos locais é a redução da toxicidade e lesão tecidual. (FERREIRA, 2014). Outro ponto a ressaltar, é que o emprego de nanotecnologia e lipossomas possuem um custo maior quando comparado ao custo da utilização da ciclodextrina, isso se transcreve em vantagem para o uso da ciclodextrina na investigação farmacológica (BIBBY et al., 2000; LIMA et al., 2012).

Considerando que a CD é o sistema de liberação controlado que apresenta melhor custo e empregabilidade e a LDC e apresenta melhor perfil de segurança para uso quando comparada a ropivacaina, bupivacaina e anestésicos do tipo éster (SAMBROOK e GOSS, 2011), além de produzir analgesia em sua formulação livre, a complexação da lidocaína em ciclodextrina pode resultar em uma molécula com perfil farmacocinético mais favorável e de fácil comercialização.

#### 1.4 DOR OROFACIAL

A dor caracteriza-se por uma resposta orgânica protetora, pois, alerta o indivíduo para uma lesão iminente ou real dos tecidos, induzindo o surgimento de respostas reflexas e comportamentais coordenadas com o intuito de manter o dano tecidual o mais controlado possível. Entretanto, em algumas situações a dor perde o caráter fisiológico e torna-se um problema patológico (WOOLF et al., 1999).

A região craniofacial constitui um pequeno segmento do corpo e possui uma estrutura complexa de tecidos, ossos, musculatura e inervação. O nervo trigêmeo ou V par craniano é composto por três ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular, e é responsável pela inervação das estruturas da região da cabeça e pescoço (DESIQUEIRA, 2006; WAITE e ASHWELL, 2004). A dor orofacial está associada, aos tecidos da cabeça, face, pescoço e estruturas da cavidade oral, ou ainda pode representar patologias em outros segmentos e/ou estruturas do corpo. Essa condição clínica possui vários fatores desencadeantes e ainda pode ser classificada em aguda ou crônica (DELGADO et al. 2009, NUNES et al., 2012).

Dores craniofaciais agudas são extremamente frequentes na população e são representadas por odontalgias, processos inflamatórios e infecções de estruturas da

face e cavidade oral, cefaleias, dentre outras. Geralmente são de fácil diagnóstico e tratamento. Por outro lado, dores craniofaciais crônicas têm uma etiologia muito variada, o que contribui para a complexidade do seu diagnóstico, bem como a dificuldade do tratamento. Exemplos de dores craniofaciais crônicas incluem neuropatias trigeminais, neuralgia do trigêmeo, dor associada a tumores de cabeça e pescoço, migrâneas, dor associada a disfunções temporomandibulares. A multiplicidade de causas para as dores e a enorme prevalência na população, indica a necessidade de estudos que avaliem novas perspectivas de tratamento e/ou alvos farmacológicos (DELGADO et al., 2009; DE SIQUEIRA, 2006; NUNES et al., 2012).

### 1.5 DOR OROFACIAL X QUALIDADE DE VIDA

A dor como condição patológica acomete milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo extremamente prejudicial. Um estudo publicado em 2016 evidenciou que a dor leva à depressão, desânimo, perturbação do sono, desequilíbrio econômico, reclusão social, além de ser a principal causa de afastamento de muitos trabalhadores (ANIRUDHAN et al., 2016).

Para a Organização mundial da saúde (OMS) a qualidade de vida é considerada como um indicador de saúde, e nos casos em que o indivíduo é acometido por dor, ocorre um impacto negativo significativo neste indicador (SILVA et al., 2012). A dor geralmente acarreta problemas para o próprio indivíduo, assim como para sociedade, visto que nestes casos geralmente o acometido precisa de atendimento em saúde e afastamentos de atividades diárias para a recuperação (SILVA et al., 2012; MCGRATH e BEDI, 2003).

Nos últimos anos, as dores orofaciais têm sido apontadas como um dos principais problemas de saúde pública, visto que são queixas comuns e bastante frequentes na população (SILVA et al., 2012). Neste aspecto, as dores orofaciais conseguem impactar pontos essenciais nas atividades diárias dos indivíduos, como alimentação, sono, cuidados com higiene bucal e autoestima (KUROIWA et al., 2011).

Para o tratamento das dores orofaciais as terapias medicamentosas empregadas engloba o uso de antiinflamatórios, analgésicos e psicotrópicos, os quais geralmente ocasionam efeitos colaterais que podem prejudicar ainda mais a qualidade de vida do indivíduo (BENOLIEL et al., 2003). O tratamento farmacológico é escolhido

de acordo com a etiologia da dor que o indivíduo apresenta, tempo de utilização e efeitos colaterais (MELO, 2011). Porém, os tratamentos utilizados ainda possuem limitações para manejo de alguns casos.

Diante disso, diversos modelos de dor na área pré-clínica são usados para mimetizar a fisiopatologia das dores orofaciais e avaliar o potencial terapêutico de novas substâncias. No presente estudo foram empregados modelos de dor orofacial aguda e crônica bem estabelecidos, inclusive pelo nosso grupo (ARAYA et al., 2017; CHICHORRO et al., 2004; GAMBETA et al., 2016; KORPUSZINSK et al., 2015), a fim de se contribuir com o avanço do controle farmacológico da dor orofacial. Dada a importância de diminuir o sofrimento e melhorar a qualidade de vida dos acometidos com os distúrbios de dor orofacial, o presente estudo procura analisar como diferentes formulações de um fármaco podem contribuir com esse campo a ser explorado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da formulação de lidocaína livre e complexada com HP- $\beta$ -CD em diferentes modelos de dor orofacial em ratos, a fim de determinar qual formulação apresentaria *in vivo* o melhor perfil analgésico.

### 2.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar se a complexação de lidocaína em ciclodextrina altera a taxa de liberação *in vitro* do anestésico.
- b) Avaliar o efeito da administração de lidocaína livre e complexada na nocicepção orofacial induzida por formalina
- c) Avaliar o efeito da administração de lidocaína livre e complexada na hiperalgesia orofacial ao calor induzida por capsaicina e carragenina;
- d) Avaliar o efeito da administração de lidocaína livre e complexada na hiperalgesia orofacial térmica e mecânica induzida por constrição de nervo infraorbital (CION).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Animais

Para este estudo foram utilizados ratos *Rattus norvegicus* variedade Wistar machos, pesando entre 180 g e 220 g provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os experimentos começaram após dois dias de ambientação prévia dos animais no biotério do laboratório.

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (entre  $21 \pm 1$  °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água, os animais tiveram a maravalha trocada em dias alternados e foram mantidos em número máximo de cinco animais por caixa.

Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR; aprovação nº 1039) e estão de acordo com as diretrizes Brasileiras do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

##### 3.1.2 Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de lidocaína (LDC, 2% em 50 µL, Sigma-AldrichCo. St. Louis, MO, EUA), Lidocaina complexada em hidroxipropil-β-ciclodextrina (LDC:HP-β-CD 2% em 50 µL, UNICAMP, Piracicaba, SP, Brasil), ambos diluídos em tampão HEPES pH 7,4, xilazina (10mg / kg, xilazina, Rhobifarma Ind. Farmacêutica, SP, Brasil), quetamina (50 mg/kg, quetamina, Vetnil Ind. Prod. Veterinários, SP, Brasil), Formalina (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Capsaicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), Carragenina (CAR, 100 µg/50 µL Sigma, St. Louis, MO, EUA). Carragenina e formalina foram dissolvidos em solução salina imediatamente antes do uso. A capsaicina foi preparada em solução estoque contendo 10% de tween 80 e 10% de etanol em PBS (pH 7,4), mantida a -18 °C e dissolvida em solução salina imediatamente antes do uso. A concentração de etanol na solução final nunca excedeu 0,5%, pois essa concentração foi relatada não causar qualquer efeito

hiperalgésico *per se* (MOTTA, et al., 2009). As doses e os esquemas de tratamento foram baseados em estudos prévios e experimentos piloto em nosso laboratório (ARAYA et al., 2017; CHICHORRO et al., 2004; GAMBETA et al., 2016; HUMMING et al., 2014; KORPUSZINSK et al., 2015).

### 3.1.3 Preparação da lidocaína complexada com HP- $\beta$ -CD (LDC:HP- $\beta$ -CD)

O complexo de inclusão sólido foi preparado pelo colaborador do projeto Dr. Luis Eduardo Ferreira na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), seguindo os protocolos propostos anteriormente (DOLLO et al., 1998; LOFTSSON e MASSON, 2001). Resumidamente, HP- $\beta$ -CD (Roquets Serv. Tech. Lab, Lestrem, França) e cloridrato de lidocaína foram adicionados à água desionizada na proporção molar 1:1. A solução foi agitada durante 24 horas à temperatura ambiente. Após atingir o equilíbrio, a solução foi liofilizada e armazenada a -20 °C. LDC:HP- $\beta$ -CD foi ressuspensa em tampão HEPES 20 mM (NaCl 150 mM, pH 7,4). O complexo foi previamente caracterizado de acordo com os dados de FERREIRA et al., 2018.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Ensaio e determinação da cinética de liberação *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* de lidocaína foi realizado utilizando o sistema de difusão vertical tipo Franz (Manual Transdermal System, da Hanson Research Corporation, Chatsworth, CA, EUA). O experimento foi realizado pelo Dr Luis Ferreira na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O sistema de diálise consiste em um compartimento doador e receptor separados por uma membrana de celulose (Spectrapore MWCO 1000 Da), com 1,77 cm<sup>2</sup> de área de permeação.

A lidocaína livre e a lidocaína complexada com HP- $\beta$ -CD foram diluídas para uma concentração final de 2% em tampão HEPES 138  $\mu$ M (150  $\mu$ M NaCl, pH 7,4) e 2 mL desta diluição das formulações foram adicionados ao compartimento doador. O compartimento receptor foi preenchido com 7mL de tampão HEPES 138  $\mu$ M (150  $\mu$ M NaCl, pH 7,4) e alíquotas de 200  $\mu$ L foram coletadas em intervalos regulares (0-6

horas). Volumes idênticos aos coletados do compartimento receptor foram substituídos pela mesma quantidade de solução tampão fresca. O experimento foi realizado a 37°C sob agitação contínua a 300 rpm. O total de cinco amostras por formulação foram coletadas para fazer a determinação do perfil de liberação dos anestésicos locais.

As amostras coletadas em diferentes momentos foram submetidas à análise de lidocaína no sistema de HPLC (Thermo® Scientific, acoplado ao amostrador automático Thermo® e ao software surveyorChromQuest 5.0), de acordo com um método validado anteriormente com pequenas modificações (FRANZ-MONTAN, 2015). Resumidamente, a lidocaína foi separada em coluna de fase reversa C18 (5 µm, 150 x 4,60 mm, Phenomenex).

A fase móvel consistia na mistura de tampão acetonitrilo (25 µM NH<sub>4</sub>OH, pH 7.0 ajudado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a uma razão em volume de 60:40, bombeada a 1 mL / minuto e um volume de injeção de 20 µL. A lidocaína foi monitorizada a 220 nm. O modelo teórico de Higuchi foi aplicado para confirmar o mecanismo de liberação do perfil de lidocaína a partir do complexo simples e de inclusão. O modelo de Higuchi segue a lei de Fick e determina se o mecanismo de liberação do fármaco depende do tempo da raiz quadrada.



FIGURA 5 –SISTEMA TRANSDÉRMICO MANUAL. Equipamento utilizado para realização do ensaio de liberação controlada *in vitro*. Fonte: Ferreira (2016)

### 3.2.2 Teste da formalina orofacial

Para avaliar a dor orofacial aguda, foi realizado o teste da formalina, como descrito anteriormente, por CLAVELOU et al., (1989), com algumas modificações. Os animais foram habituados em caixa de acrílico transparente, medindo 35x35x35 centímetros, por aproximadamente 20 minutos. Após a injeção subcutânea no lábio superior direito de formalina ou veículo, os animais foram colocados nas caixas de observação e o tempo de *grooming* facial bilateral foi registrado em intervalos consecutivos de 3 minutos, totalizando 30 minutos. A primeira e segunda fase da resposta à formalina foram consideradas 0-3 e 12-30 minutos após a injeção de formalina, respectivamente.

### 3.2.3 Constrição do Nervo Infraorbital (CION)

Como modelo de dor neuropática, utilizou-se o modelo de constrição do nervo infraorbital (CION), de acordo com o método proposto anteriormente (VOS et al., 1994) e modificado por CHICHORRO et al., 2006. Os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente, i.p). Foi realizado uma incisão na pele, abaixo do olho direito, cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior foram afastados para que a porção rostral do nervo infraorbital fosse exposta, próximo à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes e, em seguida, foram realizadas duas amarras frouxas, separadas aproximadamente 2 mm, com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio usado para a confecção das amarras. Os animais do grupo falso-operado (Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém o feixe nervoso não foi submetido à constrição. Ao término da cirurgia os animais foram mantidos em sala aquecida até sua completa recuperação da anestesia. Em diferentes períodos após a cirurgia, o desenvolvimento da hiperalgesia térmica e mecânica dos animais foi avaliado.

### 3.2.4 Avaliação da Hiperalgisia Térmica ao Calor

Para realização do experimento, o experimentador conteve os animais com uma mão e com a outra aproximou uma fonte de calor radiante, a uma temperatura próxima de 50°C. Esse estímulo foi aplicado no lado direito da face, com a distância de 1 cm da área de inserção das vibrissas. As reações de cada animal como: movimentos consecutivos e rápidos das vibrissas e tentativa de afastar a cabeça da fonte de calor foram considerados latência de reposta (tempo em segundos). Apenas animais que apresentaram essas respostas entre 9 e 20 segundos foram incluídos nos experimentos, e o tempo de corte estabelecido para evitar lesão tecidual foi 20 segundos (CHICHORRO et al., 2009).

### 3.2.5 Avaliação da Hiperalgisia Mecânica

Os estímulos mecânicos foram aplicados nos animais, após estes ficarem ambientando individualmente em caixas de observação por um período de 2 horas. O limiar de resposta foi avaliado através de filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, USA). Os filamentos possuem diferentes gramaturas em escala crescente: 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g. Cada filamento foi aplicado por três vezes consecutivas no lado direito da face na região de inserção das vibrissas, com intervalo de 3 segundos entre cada aplicação. O limiar de reposta mecânica foi considerado a gramatura do filamento que evocou por duas vezes alguma destas respostas: retirada rápida da cabeça, reações de ataque/fuga ao filamento ou *grooming* facial. Na fase inicial de seleção, apenas os animais que não apresentaram comportamentos nociceptivos com a aplicação de todos os filamentos, ou seja, que obtiveram um limiar mecânico superior a 8,0 g, antes de serem submetidos à CION, foram incluídos nos experimentos subsequentes.

### 3.2.6 Procedimentos experimentais

Grupos independentes de animais foram utilizados em cada procedimento experimental. No teste da formalina, os animais receberam uma injeção local (i.e., no lábio superior direito) do veículo (50  $\mu$ L), lidocaína livre (LDC, 2% em 50  $\mu$ L) ou lidocaína complexada (LDC:HP- $\beta$ -CD, 2% em 50  $\mu$ L) e após 10 minutos receberam uma injeção de veículo (solução salina estéril 0,9%, 50  $\mu$ L) ou formalina (2,5%/50  $\mu$ L) no mesmo local. Na hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina, a latência para estimulação térmica foi avaliada antes de qualquer tratamento, seguida de injeção subcutânea no lábio superior do veículo (50  $\mu$ L), LDC (2% em 50  $\mu$ L) ou LDC:HP- $\beta$ -CD (2% em 50  $\mu$ L). Após 10 minutos, receberam uma injeção de veículo ou capsaicina (3  $\mu$ g / 50  $\mu$ L) no lábio superior direito e a hiperalgesia ao calor facial foi avaliada em até 4<sup>a</sup> hora. Na hiperalgesia induzida por carragenina, os mesmos tratamentos locais foram realizados, mas apenas 150 minutos após a injeção de carragenina e a avaliação da hiperalgesia do calor facial prosseguiu até a 6<sup>a</sup> hora.

No modelo CION, hiperalgesia ao calor e hiperalgesia mecânica foram avaliadas 5 e 15 dias após a cirurgia, respectivamente, antes de qualquer tratamento, em 30 minutos até a 4<sup>a</sup> hora após injeção local de LDC (2% em 50  $\mu$ L) ou LDC:HP- $\beta$ -CD (2% em 50  $\mu$ L) ou veículo. A linha temporal dos protocolos experimentais desse estudo pode ser observada no anexo.

### 3.2.7 Análise estatística

Os dados obtidos no teste de ensaio e determinação da cinética de liberação *in vitro* foram analisados por meio do teste t Student independente. Os resultados obtidos em testes *in vivo* foram analisados por meio de Anova de uma via (Fig 7B e C) ou ANOVA de duas vias com medidas repetidas (Fig 7A, 8, 9 e 10), seguido de teste post hoc de Bonferroni para determinar as diferenças entre os grupos experimentais. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM e valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

A figura 6 mostra o perfil de liberação *in vitro* das duas formulações de lidocaína. A complexação de lidocaína em HP- $\beta$ -CD levou a uma redução na liberação de lidocaína do compartimento doador ao longo do tempo. O atraso foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) na formulação LDC:HP- $\beta$ -CD em comparação com a lidocaína livre de 30 a 360 minutos.

O modelo teórico utilizado confirmou que a taxa de liberação do complexo de inclusão segue o modelo de Higuchi, conforme observado pelo alto valor do coeficiente de correlação observado para LDC e LDC:HP- $\beta$ -CD ( $R^2 = 0,9958$  e  $0,9885$ , respectivamente). A regressão linear foi utilizada para determinar a constante de liberação e os valores foram  $0,016 \text{ minutos}^{-1}$  e  $0,013 \text{ minutos}^{-1}$  para lidocaína e LDC:HP- $\beta$ -CD, respectivamente.

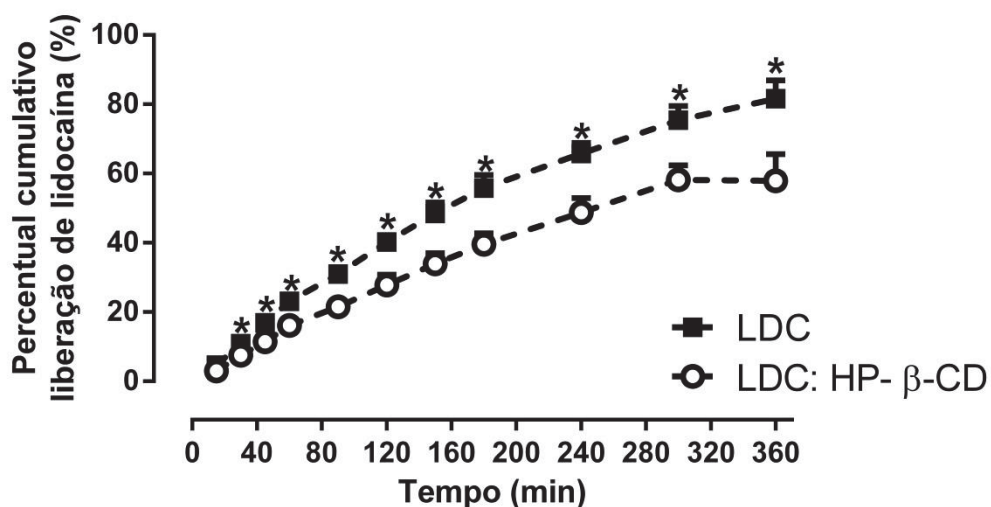


Figura6 – ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*. Liberação cumulativa de lidocaína livre (LDC) e lidocaína complexada com HP- $\beta$ -CD (LDC:HP- $\beta$ -CD) em tampão HEPES  $138 \mu\text{M}$  ( $150 \mu\text{M NaCl}$ , pH 7,4) a  $37^\circ\text{C}$  ( $n = 5$ ). Os dados mostram a média  $\pm$  SEM, \* indica diferença estatística entre LDC e LDC:HP- $\beta$ -CD quando comparado nos mesmos tempos,  $p < 0,05$ , teste-t.

#### 4.2 EFEITO COMPARATIVO DA LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA OROFACIAL

A figura 7 mostra a indução das respostas nociceptivas pela administração de formalina no lábio superior de ratos. O painel A mostra o decurso temporal do *grooming* facial induzido pela formalina. A injeção de formalina (2,5% em 50  $\mu$ l) no lábio superior induziu um aumento na resposta durante os primeiros três minutos (fase I) e de 12 a 30 minutos (fase II) após a injeção, em comparação com o grupo que recebeu a injeção de solução salina (VEÍC-SAL). A administração de lidocaína (LDC) livre no lábio superior direito (2% em 50  $\mu$ l, s.c.), 10 minutos antes da injeção de formalina aboliu a primeira fase e reduziu significativamente a segunda fase, mais especificamente durante 21 a 24 minutos. Da mesma forma, a injeção de LDC:HP- $\beta$ -CD (mesma dose e via de administração), 10 minutos antes da injeção de formalina, aboliu a primeira fase, mas promoveu um efeito mais duradouro na segunda fase, (durante 18 a 27 minutos em comparação ao grupo LDC). Os painéis B e C apresentam a resposta total de *grooming* facial durante a primeira e segunda fase de resposta, respectivamente. LDC e LDC:HP- $\beta$ -CD causaram uma redução na resposta de *grooming* facial na primeira e segunda fases em comparação ao grupo controle (VEÍC-FORM). No painel A, os dados dos animais tratados com LDC+VEÍC ou LDC:HP- $\beta$ -CD+VEÍC não foram apresentados a fim de aumentar a clareza (dados não mostrados).

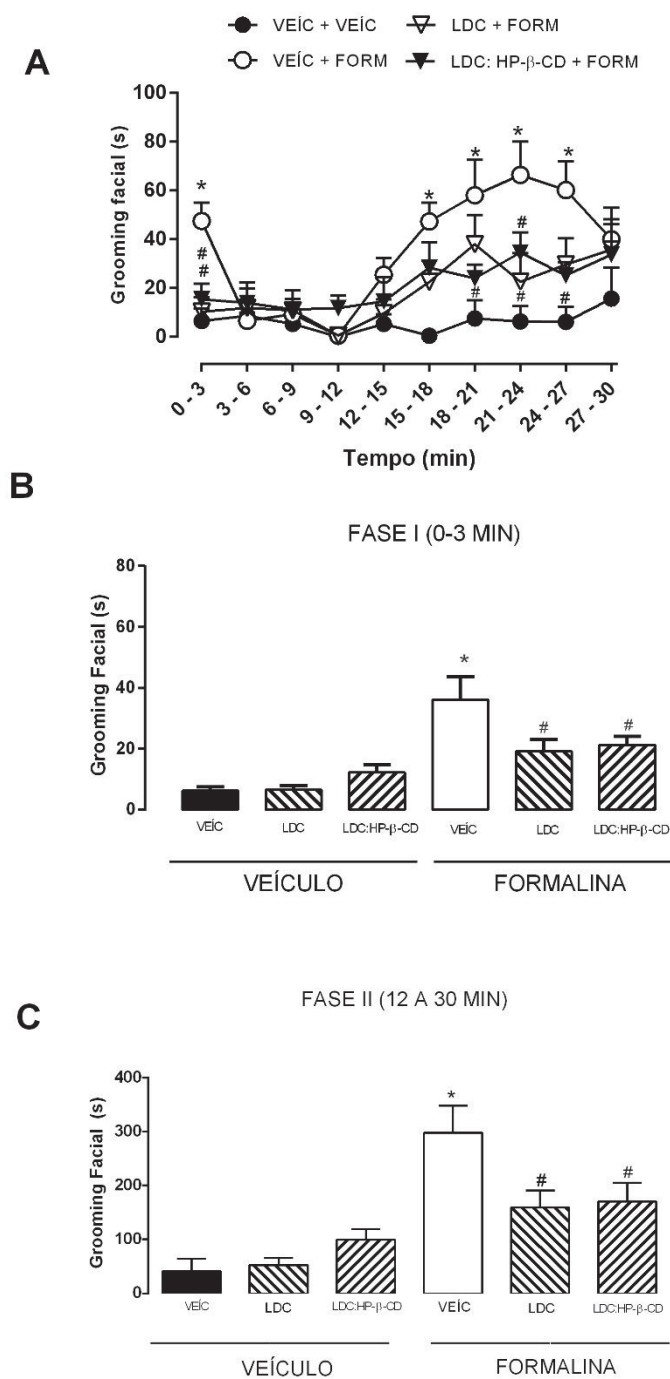


FIGURA 7: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA. Efeito da lidocaína livre (LDC) e lidocaína complexada com HP- $\beta$ -CD (LDC:HP- $\beta$ -CD) no teste de formalina orofacial. Painel A mostra o efeito de LDC e LDC:HP- $\beta$ -CD administrado no lábio superior de ratos (2% em 50  $\mu$ L, s.c.) na nocicepção induzida por injeção de formalina (FORM, 2,5% em 50  $\mu$ L, lábio superior s.c.) ou veículo (VEIC, 50  $\mu$ L, s.c.). Painéis B e C mostram o efeito de LDC e LDC:HP- $\beta$ -CD na resposta de *grooming* induzida por injeção de formalina (2,5% 50  $\mu$ L, lábio superior, s.c.) na primeira e segunda fase, respectivamente. O comportamento de *grooming* foi avaliado a cada 3 minutos por 30 minutos. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 6-11 animais. \*indica  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo VEÍC+VEÍC e #indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo VEÍC+FORM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de Bonferroni (para o painel A) e ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni (para os painéis B e C).

#### 4.3 EFEITO COMPARATIVO DA LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA HIPERALGESIA AO CALOR INDUZIDA POR CAPSAICINA

A figura 8 mostra que a capsaicina injetada no lábio superior dos animais, induziu uma redução na latência para resposta ao estímulo térmico em comparação com o grupo controle (VEÍC+VEÍC) durante 2 horas, indicando hiperalgesia orofacial térmica. Ambas as formulações, administradas 10 minutos antes da capsaicina, causaram um aumento na latência para resposta entre 30 minutos a 1 hora após os tratamentos, porém sem diferença entre os grupos. Animais tratados com LDC+VEÍC ou LDC:HP- $\beta$ -CD+VEÍC não apresentaram alterações significativas na latência para resposta quando comparados com o grupo controle (VEÍC+VEÍC) em todos os tempos avaliados, e a fim de aumentar a clareza da figura esses dados não foram incluídos (dados não mostrados).

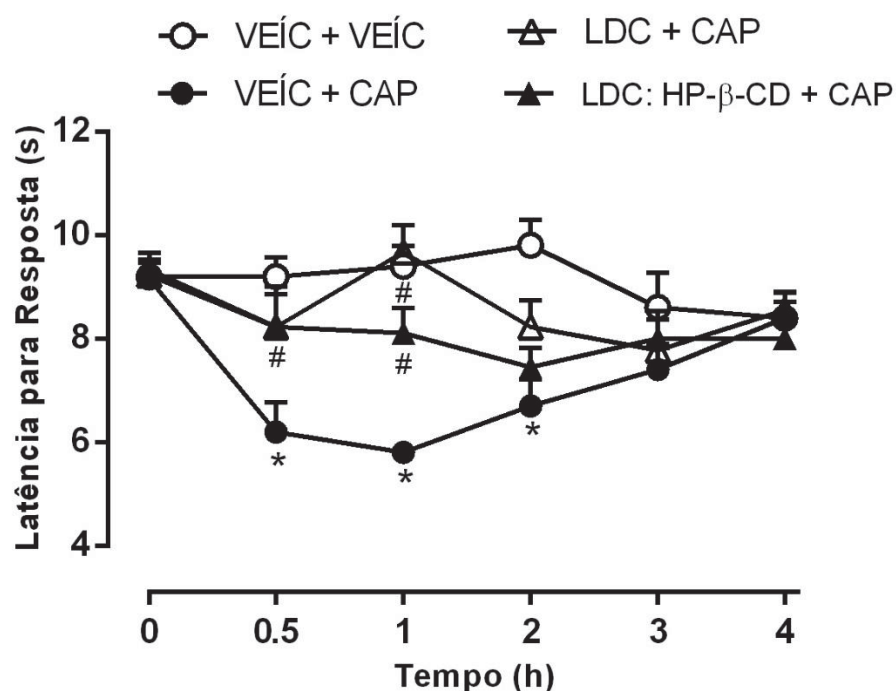


FIGURA 8 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA HIPERALGESIA OROFACIAL AO CALOR INDUZIDA POR CAPSAICINA. A latência de resposta dos animais ao calor foi avaliada antes da administração de capsaicina (tempo 0). Logo após os animais foram tratados com LDC (2% em 50  $\mu$ L) ou LDC:HP- $\beta$ -CD ou VEÍC (50  $\mu$ L, lábio superior, s.c). Dez minutos após os tratamentos, os animais receberam a administração da capsaicina (3  $\mu$ g/50  $\mu$ L, lábio superior s.c.). A hiperalgesia térmica induzida por capsaicina foi avaliada no período de 30 minutos até 4<sup>a</sup> hora. \* indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo VEÍC+VEÍC e # indica  $p < 0,05$  em relação ao grupo VEÍC+CAP. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM de 5-10 animais. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni.

#### 4.4 EFEITO COMPARATIVO DA LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA HIPERALGESIA OROFACIAL AO CALOR INDUZIDA POR CARRAGENINA

A Figura 9 mostra a redução na latência da resposta induzida pela injeção de carragenina no lábio superior de ratos entre 2 a 5 horas após a administração. LDC e LDC:HP- $\beta$ -CD foram administrados 150 minutos após a injeção de carragenina. LDC aumentou a latência para resposta por 1,5 horas, enquanto que a LDC:HP- $\beta$ -CD apresentou efeito anti-hiperalgésico significativo por 2 horas. Além disso, a magnitude do efeito da LDC:HP- $\beta$ -CD foi significativamente superior à LDC na 2ª e na 3ª após a injeção do tratamento. Animais tratados com LDC+VEÍC ou LDC:HP- $\beta$ -CD+VEÍC não apresentaram alterações significativas na latência para resposta quando comparados com o grupo controle (VEÍC+VEÍC) em todos os tempos avaliados, e a fim de aumentar a clareza da figura esses dados não foram incluídos (dados não mostrados).

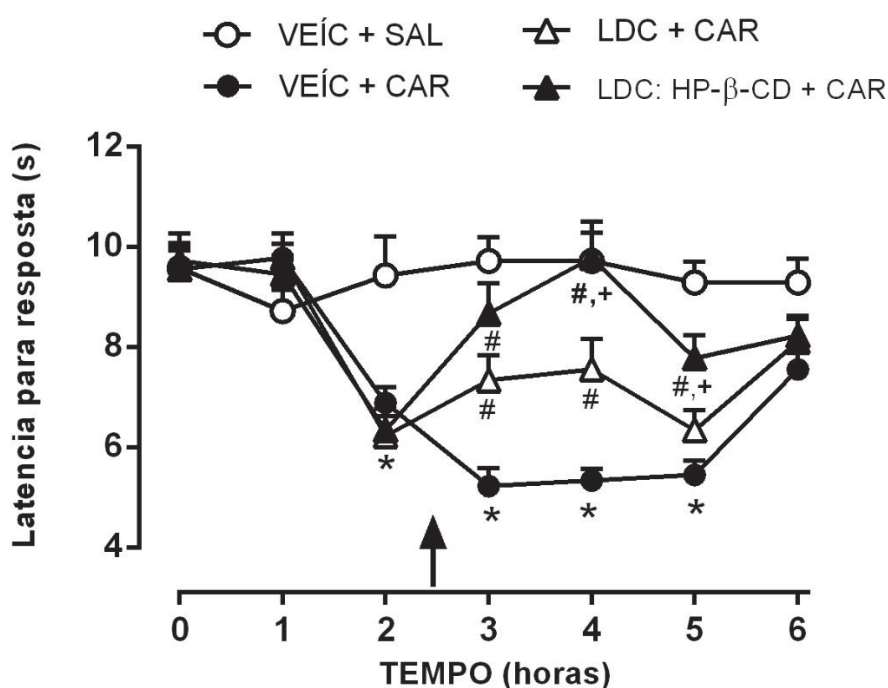


FIGURA 9 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA HIPERALGESIA OROFACIAL AO CALOR INDUZIDA POR CARRAGENINA. A Latência de resposta dos animais ao calor foi avaliada antes da administração de carragenina (tempo 0). Logo após os animais foram tratados com carragenina (100  $\mu$ g/50  $\mu$ L, lábio superior, s.c.) e a hiperálgia térmica foi avaliada por 6 horas. No tempo indicado pela seta (150 min pós carragenina) os animais foram tratados com LDC (2% em 50  $\mu$ L) ou LDC:HP- $\beta$ -CD (2% em 50  $\mu$ L) ou VEÍC (50  $\mu$ L, lábio superior, s.c.). \* indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo VEÍC+VEÍC, #indica  $p < 0,05$  em relação ao grupo VEÍC+CAR e + indica  $p < 0,05$  em relação ao grupo LDC+CAR. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM de 6-9 animais. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni.

#### 4.5 EFEITO COMPARATIVO DA LDC E LDC:HP- $\beta$ -CD NA HIPERALGESIA OROFACIAL TÉRMICA E MECÂNICA INDUZIDA POR CION

A figura 10 (painel A) mostra a hiperalgesia térmica induzida por CION no 5º dia, em comparação com o grupo sham. LDC (2% em 50  $\mu$ L) injetada no lábio superior reduziu a hiperalgesia térmica associada à lesão do nervo entre 30 minutos até a 1ª hora após o tratamento, enquanto que o tratamento com LDC:HP- $\beta$ -CD, na mesma dose e via de administração resultou em um efeito anti-hiperalgésico de maior magnitude e mais prolongado (i.e. de 30 minutos a 2ª hora após o tratamento).

O painel B da figura 10 mostra a hiperalgesia mecânica induzida por CION, que foi avaliada 15 dias após a cirurgia. Animais submetidos à constricção do nervo infraorbital apresentaram uma redução significativa do limiar mecânico em comparação aos animais do grupo sham, indicando o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica orofacial. As duas formulações de lidocaína testadas, injetadas no lábio superior, promoveram um aumento similar no limiar mecânico, que persistiu até a 2ª hora após a administração. Entretanto, o efeito da LDC livre foi detectado mais rapidamente, aos 30 minutos após a administração, enquanto que a LDC:HP- $\beta$ -CD alterou o limiar mecânico entre a 1ª e 2ª horas após a injeção (Fig. 10B).

Em ambos os painéis, animais tratados com LDC+VEÍC ou LDC:HP- $\beta$ -CD+VEÍC não apresentaram alterações significativas na latência para resposta quando comparados com o grupo controle (VEÍC+VEÍC) em todos os tempos avaliados, e a fim de aumentar a clareza da figura esses dados não foram incluídos (dados não mostrados).

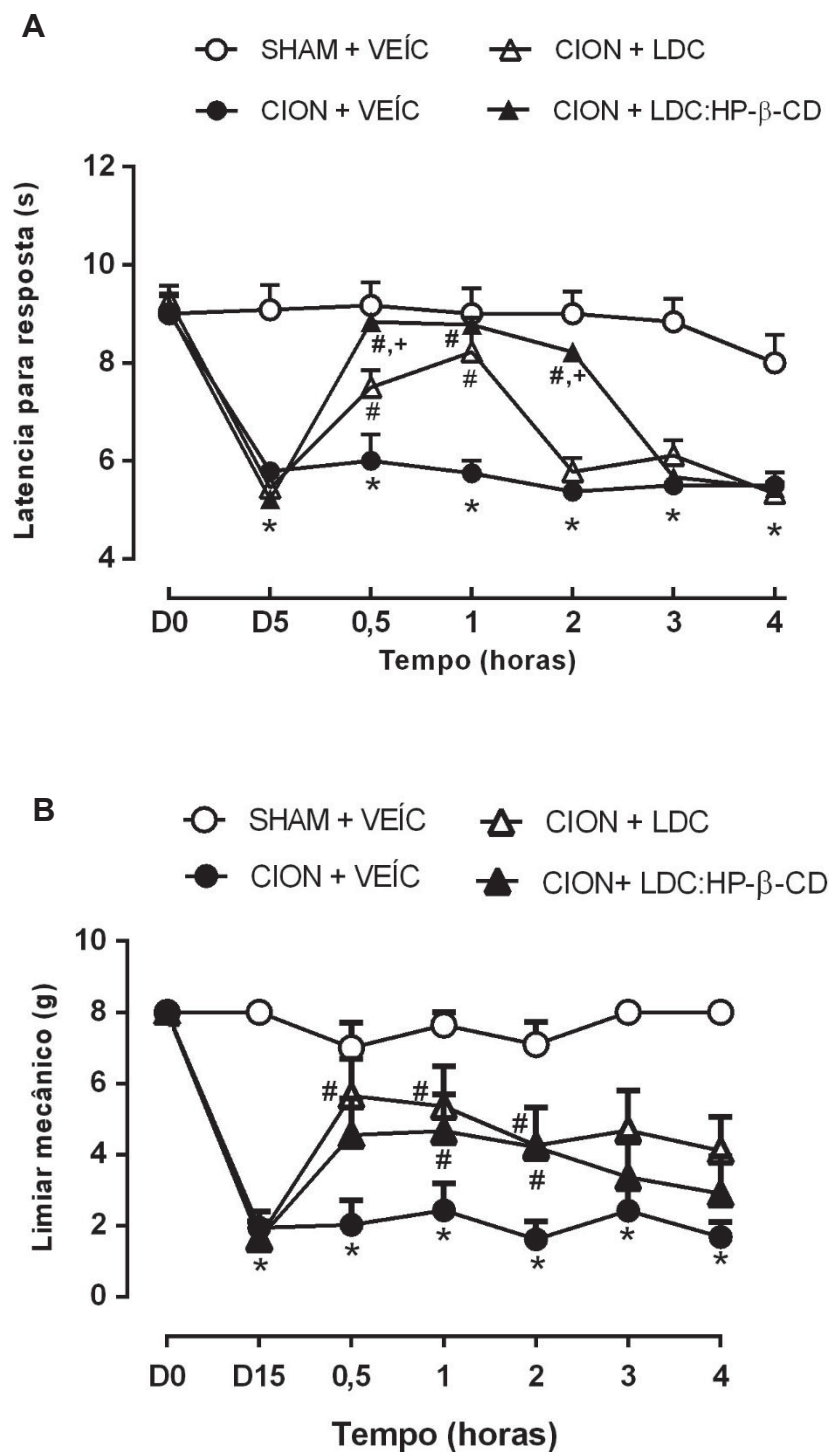


Figura 10 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LDC E LDC:HP-β-CD NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA INDUZIDA POR CION. A resposta dos animais ao estímulo térmico e mecânico foi avaliada antes (D0) e em seguida, os mesmos foram submetidos à constrição do nervo infraorbital (CION) ou procedimento cirúrgico controle (sham). Pannel A - efeito da LDC (2%/50 μL), LDC:HP-β-CD (2%/50 μL) ou veículo (VEÍC, 50 μL) na hiperalgisia ao calor no dia 5 após a cirurgia. Pannel B -efeito da LDC (2%/50 μL), LDC:HP-β-CD (2%/50 μL) ou veículo (VEÍC, 50 μL) na hiperalgisia mecânica no dia 15 após a cirurgia. A hiperalgisia térmica (panel A) e mecânica (panel B) foram avaliadas até 4 horas após os tratamentos. \*indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo SHAM+VEÍC, #indica  $p < 0,05$  em relação ao grupo CION+VEÍC e + indica  $p < 0,05$  em relação ao grupo CION+LDC. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM de 6-9 animais. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni.

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo comparou duas formulações de lidocaína, livre e complexada com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, na tentativa de identificar se há um benefício significativo da alteração das propriedades físico-químicas da LDC, em relação aos seus efeitos antinociceptivos em diferentes modelos de dor orofacial.

Os resultados do presente estudo demonstraram que ambas as formulações de lidocaína são capazes de apresentar efeito analgésico em diferentes modelos de dor orofacial. Os achados corroboram estudos prévios que evidenciam a capacidade da lidocaína de atenuar a dor, por atuar no bloqueio da condução nervosa, e também influenciar na modulação sobre mediadores inflamatórios. Nossos resultados indicam que a LDC:HP- $\beta$ -CD causa uma redução mais pronunciada e duradoura em alguns dos modelos de dor orofacial avaliados neste estudo.

Os sistemas de liberação de medicamentos atuam como reservatórios, retardando a liberação do anestésico local, estabilizando e aumentando a biodisponibilidade do fármaco. O efeito duradouro do bloqueio nervoso está diretamente relacionado à modificação que a ciclodextrina causa no mecanismo farmacológico do anestésico. Inicialmente, a solubilidade e a penetração do fármaco são os dois parâmetros mais importantes no processo de absorção das moléculas modificadas (WILLIAMS et al., 2013).

A HP- $\beta$ -CD é capaz de se difundir livremente do local da injeção, superando as barreiras fisiológicas com sua porção hidrofílica, conseguindo alcançar o local de ação de maneira facilitada quando comparado com a formulação livre. Nas fibras nervosas a CD irá exercer o comportamento de liberação sustentada, mantendo o equilíbrio de ionização das moléculas de LDC, garantindo a presença delas em forma carregada e não carregada no axoplasma, de acordo com o pH fisiológico (CERADA et al., 2006; WILLIAMS et al., 2013).

Este processo de atravessar as barreiras fisiológicas e manter a molécula do composto estabilizada em sua conformação original é um pré-requisito importante para o sucesso da entrega do fármaco no local de ação (LAURETTI, 2008). Deste modo, a CD permitirá que o fármaco seja capaz de se ligar no sítio de ação imediatamente ao chegar ao local de ação, porque o início da anestesia está diretamente relacionado à quantidade de anestésico local na forma solúvel em lipídios

terciários (CERADA et al., 2006). Outro ponto a ressaltar é que, a CD irá impedir a difusão da LDC para a circulação sistêmica. Assim, outra maneira pela qual a complexação em HP- $\beta$ -CD pode melhorar as propriedades farmacológicas da LDC é evitar sua dispersão a partir do local injetado (YOU et al., 2017).

Portanto, a CD irá aumentar a eficácia da LDC, pois, ela remove os fatores limitantes do fármaco no organismo, que são a dispersão do sítio de ação e metabolização, promovendo o prolongamento do bloqueio nervoso (CERADA et al., 2006; LAURETTI, 2008; WILLIAMS et al., 2013).

A fim de mostrar a mudança na taxa de liberação entre as duas formulações foi realizado o experimento de liberação *in vitro*. Estudos de liberação com célula de difusão vertical, utilizando uma membrana de celulose de fluxo rápido, são um dos métodos mais comuns descritos para verificar a formação do complexo droga + ciclodextrina e para comprovar a atuação da CD como sistema de liberação controlada (SHEN e BURGESS, 2012).

A membrana de celulose é seletivamente permeável à lidocaína livre, mas retém o complexo HP- $\beta$ -CD. A complexação da lidocaína em  $\beta$ -CD modificou a taxa de liberação do fármaco do compartimento doador entre 30 minutos até a 6ª hora de realização do experimento. Além disso, a análise de regressão demonstrou que a liberação de lidocaína do complexo de inclusão é um processo dependente da difusão, assim como demonstrado para lidocaína encapsulada em lipossomas (LOFTSSON e MASSON, 2001).

A liberação de outros anestésicos locais do complexo de inclusão HP- $\beta$ -CD também foi relatada em estudos prévios (de ARAÚJO et al., 2008; PINTO et al., 2005). Por essa razão, apesar das limitações do modelo *in vitro*, este ensaio foi importante como teste inicial para demonstrar que a complexação retarda a liberação do fármaco para o compartimento receptor de maneira significativa. Vale ressaltar que a caracterização completa do complexo HP- $\beta$ -CD-lidocaína já foi demonstrada em estudos anteriores, aplicando, além da liberação *in vitro*, outras técnicas como estudo de solubilidade de fase, difratometria de raios-x de ressonância magnética, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise de raio-X, e outros métodos (ANIRUDHAN et al., 2016; SHEN e BURGESS, 2012). A formação de complexo de LDC:HP- $\beta$ -CD usada no presente estudo foi confirmada por calorimetria diferencial de varredura e microscopia eletrônica de varredura em um estudo anterior (FERREIRA et al., 2018).

Depois de demonstrada a diferença *in vitro* na taxa de liberação das moléculas, foram realizados experimentos *in vivo* com diferentes modelos de dor orofacial a fim de caracterizar diferenças no efeito antinociceptivo que poderiam estar relacionadas com os aspectos farmacocinéticos de cada droga.

O teste de formalina orofacial em ratos é um modelo válido e confiável de nocicepção e é sensível a várias classes de drogas analgésicas (DALLEL et al., 1995). A formalina tipicamente produz uma resposta de dor bifásica, com a primeira fase representando a ativação direta dos nociceptores e a segunda fase o processo de sensibilização central devido à atividade das fibras aferentes em curso e inflamação localizada (TJØLSEN et al., 1992). Foi demonstrado que a injeção local prévia de lidocaína abole a primeira fase da resposta à formalina, e pode causar uma redução significativa da segunda fase, sugerindo que ambas as fases dependem, pelo menos em parte, da ativação dos aferentes primários (DALLEL et al., 1995).

De acordo com essas observações, mostramos que ambas as formulações de LDC aboliram a primeira fase da resposta nociceptiva induzida pela formalina. Em relação à segunda fase, apesar de não haver diferença significativa na influência das duas formulações no tempo total que os animais passaram realizando o *grooming* facial, quando avaliado cada intervalo de tempo, a LDC:HP- $\beta$ -CD mostrou rápido início (i.e. em 18-21 minutos) e uma duração de ação mais longa (i.e. até 27 minutos) em comparação com a formulação livre, que forneceu uma redução significativa do comportamento de *grooming* facial apenas no intervalo de 21-24 minutos. Corroborando essa observação, DALLEL et al., 1995, demonstraram que a habilidade da LDC em influenciar a segunda fase da resposta à formalina foi alterada dependendo do volume da solução que foi administrada no lábio superior de ratos. A duração do bloqueio da segunda fase da resposta à formalina foi maior quando foi injetado maior volume de solução, sugerindo que facilitar a difusão do fármaco aumentaria a duração do bloqueio.

Deste modo, quando a formulação complexada é administrada a resposta é prolongada, sem precisar aumentar o volume, pois, a CD reduz os fatores limitantes da LDC no local de ação, e facilita a difusão do fármaco pelos tecidos (CERADA et al., 2006; LAURETTI, 2008; WILLIAMS et al., 2013). Esses resultados corroboram com outros ensaios *in vivo*, que demonstram um aumento da duração do bloqueio nervoso dos anestésicos complexados em sistemas de liberação sustentada em

relação à formulação livre (ARAÚJO et al., 2008; FERREIRA, 2014; SHIPTON, 2011; SERPE et al., 2014).

Estudos anteriores demonstram extensivamente que a hiperalgisia térmica sob condições inflamatórias e de dor neuropática é mediada pela ativação dos receptores TRPV1, que são expressos quase exclusivamente em neurônios peptidérgicos e não peptidérgicos de pequeno diâmetro (HUANG et al., 2006; TA et al., 2010; TENDER et al., 2008; TJØLSEN et al., 1992). Os receptores TRPV1 são canais não seletivos de cátion responsivos a uma variedade de estímulos, incluindo capsaicina, pH baixo, calor, vanilóides endógenos e gradientes de pressão osmótica (BREDERSON et al., 2013)

A administração de capsaicina no lábio superior de ratos provoca comportamento nociceptivo, bem como hiperalgisia ao calor pela ativação dos receptores TRPV1. Portanto, o teste da capsaicina é considerado um método importante para uma triagem inicial de novos compostos analgésicos (ARAYA et al., 2017; GAMBETA et al., 2016; HUMMING et al., 2014; KORPUSZINSK et al., 2015). Os resultados do presente estudo mostraram que a injeção de capsaicina no lábio superior resultou em hiperalgisia facial que durou cerca de 2 horas, o que está de acordo com observações prévias do nosso grupo (ARAYA et al., 2017; HUMMING et al., 2014; KORPUSZINSK et al., 2015). Ambas as formulações de lidocaína foram capazes de reduzir a hiperalgisia térmica induzida pela capsaicina por até 1 hora, mas nenhum efeito adicional foi detectado com a lidocaína complexada com HP- $\beta$ -CD.

Por outro lado, a formulação complexada proporcionou um bloqueio da hiperalgisia induzida por carragenina mais proeminente e mais duradouro em comparação com a formulação livre. Esse achado está de acordo com observações prévias de que a hiperalgisia inflamatória induzida por carragenina é passível de ser reduzida por diferentes anestésicos locais. Além disso, esses estudos sugeriram que a duração do efeito do anestésico local na hiperalgisia induzida por carragenina estaria relacionada à duração do bloqueio do nervo e, portanto, formulações que poderiam fornecer bloqueio de longa duração seriam úteis, inclusive para analgesia preemptiva (KISSIN et al., 1998; FLETCHER et al., 1996; LANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 1996).

É importante mencionar que há inúmeras evidências pré-clínicas e clínicas de que a lidocaína apresenta efeitos anti-inflamatórios, causando a redução de várias

citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  (BERCK et al., 2018; FERREIRA et al., 2018; JOO et al., 2011; LANG et al., 2010; ORTIZ et al., 2016; WANG et al., 2011). Considera-se que esse efeito contribui para as propriedades analgésicas da LDC em alguns estados de dor em condições clínicas (para revisão, ver BERCK et al., 2018). Em adição, essas propriedades anti-inflamatórias da LDC poderiam explicar o efeito de ambas às formulações na segunda fase da resposta à formalina, bem como na hiperalgesia térmica induzida pela carragenina, considerando que ambas possuem um componente inflamatório bem caracterizado. É válido mencionar ainda que existem evidências que indicam que a LDC consegue atuar em mecanismos adicionais ao bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem, sendo capaz de bloquear receptores NMDA, atuar em canais de potássio, canais de cálcio e receptores acoplados à proteína G (HAHNENKAMP et al., 2006; HOLLMANN et al., 2001; JOO et al., 2011; WANG et al., 2011). Estas ações parecem contribuir para o seu efeito analgésico e antiinflamatório, e reforçam a ideia de explorar o potencial de formulações modificadas de lidocaína para o tratamento da dor.

A aplicação periférica de anestésicos locais em forma de emplastos, tratamento tópico ou injeções subcutâneas tem proporcionado efeitos benéficos com efeitos colaterais muito limitados para pacientes que sofrem de dor neuropática localizada, incluindo dor neuropática trigeminal (CASALE et al., 2017; DACH et al., 2015; DI STANI et al., 2015; NI et al., 2017; SABATOWSKI et al., 2017; TAMBURIN et al., 2014;).

Os resultados do presente estudo demonstraram que a LDC:HP- $\beta$ -CD causou uma redução mais pronunciada e duradoura na hiperalgesia térmica induzida pela constrição do nervo infraorbital, em comparação com a formulação livre. Em contraste, ambas as formulações causaram uma redução similar na hiperalgesia mecânica associada a este modelo de dor neuropática trigeminal. Esses resultados reforçam a ideia de que os canais de sódio representam um alvo no controle da dor na neuralgia do trigêmeo (ZAKRZEWSKA et al., 2017). Corroborando nossos dados, um estudo que avaliou a lidocaína complexada em moléculas de ciclodextrina verificou que a complexação promoveu um aumento da duração da anestesia do nervo ciático em modelo experimental de dor (SUZUKI et al., 2009)

Por fim, é válido mencionar que o uso de ALs tem sido associado com a redução de metástase e reincidência de tumores (WADA et al., 2007). Nesse sentido, um estudo recente demonstrou que em carcinoma de células escamosas humanas *in*

*vitro* a lidocaína foi capaz de induzir citotoxicidade e reduzir a proliferação celular e, esses efeitos foram potencializados com o uso da formulação complexada em CD (FERREIRA et al., 2018). Esses resultados sugerem que em casos de câncer de cabeça e pescoço a lidocaína poderia contribuir tanto no controle da dor quanto no controle da progressão da doença.

Portanto, modificações na estrutura da lidocaína que resultam em melhor potencial farmacológico, contribuem positivamente para o manejo terapêutico da dor, especialmente na clínica, de forma a melhorar a qualidade de vida de indivíduos acometidos por dor orofaciais.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que ambas as formulações apresentaram efeito antinociceptivo em todos os modelos de dor avaliados. Entretanto, a lidocaína complexada com HP- $\beta$ -CD apresentou melhor efeito, em termos de duração e magnitude, na segunda fase da resposta à formalina e na hiperalgesia térmica induzida pela carragenina e associada à constrição do nervo infraorbital. Nossos dados sugerem que a lidocaína pode representar uma droga útil para tratamento da dor de origem orofacial, especialmente se modificações na sua molécula resultarem em um perfil farmacocinético mais favorável.

## REFERÊNCIAS

- ALMAHREZI A, et al. Intravenous Lidocaine for Refractory Chronic Orofacial Pain: Two case reports and a literature review. **Sultan Qaboos Univ Med J.** v. 8, n.2, p.205–209, 2008.PMID: 21748060
- ANIRUDHAN TS, et al. Fabrication of a bioadhesive transdermal device from chitosan and hyaluronic acid for the controlled release of lidocaine. **Carbohydrate Polymers.** v.152, p.687–698, Nov 2016.PMID:27516320.
- ARAYA EI et al. Role of peripheral and central TRPV1 receptors in facial heat hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Brain Res.** v.1, n.1670, p.146–155, Set 2017. PMID: 28606782.
- BECKER DE, REED KL. Local Anesthetics: Review of Pharmacological Considerations. **AnesthProg.** v.59, n.2, p.90-101, 2012.PMID:22822998.
- BENOLIEL R. et al. Management of chronic orofacial pain: today and tomorrow. **CompendContinEduc Dent.** v. 21, n. 12, p. 909-20, 922-4, 926-8, 2003. PMID: 14733159.
- BERK, T et al. The Use and Method of Action of Intravenous Lidocaine and Its Metabolite in Headache Disorders. **HeadacheCurrents**, Mar 2018.
- BIBBY DC, et al. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. **Int J Pharm.** v.197, n.1-2, p.1-11, Mar 2000. Disponível em: PMID:10704788.
- BREDESON JD, et al. Targeting TRP channels for pain relief. **Eur J Pharmacol.** v.716, n.1-3, p.61-76, Set 2013. PMID: 23500195.
- BUNDSCHERER AC et al. Effects of lidocaine on HT-29 and SW480 colon cancer cells in vitro. **Anticancer Res.** v.37 n.4, p.1941-1945, Abr 2017.PMID: 28373464.
- BUTTERWORTH JF 4th, Strichartz, GR. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. **Anesthesiology.** v.72, n.4, p.711-734, Abr 1990.PMID:2157353.
- Carvalho C. **Análise funcional do bloqueio ciático em ratos com lidocaína associada à hialuronidase em Complexação com hidroxiprobil-β-ciclodextrina e citotoxicidade.** 99 f. Dissertação (mestrado em odontologia) pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. 2014
- CASALE R, et al. Reduction of painful area as new possible therapeutic target in post-herpetic neuropathic pain treated with 5% lidocaine medicated plaster: a case series. **J Pain Res.** v.7, p.353–357, Jun 2014.
- CASSUTO J. et al. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. **Acta Anaesthesiol Scand.** v.50, p.265–82, Mar 2006.

CATTERALL WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v.26, n.1, p.13-25, Abr 2000. PMID:10798388.

CERADAMS et al. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. **Can J Anesth**. v.53, n.11, p.1092–1097. Nov 2006. PMID: 17079635.

CHAUDHRY P, FRIEDMAN DI. Intravenous lidocaine treatment in classical trigeminal neuralgia with concomitant persistent facial pain. **Headache**. v.54, n.8, p.1376-9, Set 2014. ISSN 0017-8748

CHICHORRO, J, **Neuralgia de trigêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental 193 f.** Tese (Doutorado em Farmacologia) Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CHICHORRO, J. G. et al. Endothelins as pronociceptive mediators of the rat trigeminal system: Role of ETA and ETB receptors. **Brain Research**, v. 1345, p. 73-83, Jul 2010. ISSN 0006-8993.

CHICHORRO, J. G. et al. Mechanisms operated by endothelin ET(A) and ET(B) receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**, v. 43, n. 2, p. 133-142, Apr 2009. ISSN 0143-4179.

CLAVELOU P et al., Application of formalin test to study of orofacial pain in the rat. **NeurosciLett**. v.103, n.3, p.349-353, Set 1989. PMID:2812522.

Courtney K, Strichartz G. Structural elements which determine local anesthetic activity. In: Strichartz GR ed. **Local Anesthetics: Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol. 81. Springer-Verlag: Berlin; 1987. p. 53-94.

DACH F, et al. Nerve block for the treatment of headaches and cranial neuralgias - a practical approach. **Headache**. v.55, n.1, p.59-71, Fev 2015. PMID:25644836.

DALLEL R et al. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**. v.61, p.11-16, Abr 1995. PMID:7644233.

de ARAÚJO DR, et al. Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic propivacaine. **J Pharm Pharmacology**. v.60, n.11, p. 1449-57, Nov 2008. PMID:18957165.

DELGADO APN et al. Caracterização da dor orofacial. In: XIII Encontro latino americano de iniciação científica. 2009, Paraíba

de JESUS et al. Theoretical and experimental study of a praziquantel and  $\beta$ cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. v.41, n. 4, p. 1428-1432, Jun 2006.

de PAULA E, SHREIER S. Molecular and physico chemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. **Braz J Med Biol Res.** v.29, n.7, p.877-894, Jul 1996.PMID:9070377.

de PAULA E, et al. Drug delivery systems for local anesthetics. **Recent Pat Drug Deliv Formul.** v.4, n.1, p.23-34, Jan 2010.PMID:19807683.

de SIQUEIRA, J. T. T. As dores orofaciais na prática hospitalar – Experiencia brasileira. **Rev. Prática Hospitalar.** v. 8, n.48, p. 85-89, 2006.

DI STANI F, et al. Combination of pharmacotherapy and lidocaine analgesic block of the peripheral trigeminal branches for trigeminal neuralgia: a pilot study. **Arq.Neuro-Psiquiatr.** v.73, n.8, p.660-664, Ago 2015.ISSN 0004-282X.

DOLLO G, et al., Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- $\beta$ -CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. **Int J Pharm** v.164, p.11-19, Abr 1998.

DOLLO G, et al. Biopharmaceutics of local anesthetic-cyclodextrin complexes following loco-regional administration. **Ann Pharm Fr.** v.58, p.425-432, Dez 2000.

DONG K, et al. Molecular Biology of insect sodium channels and pyrethroidresistance. **Insect Bio chem Mol Biol.** v.50, p.1-17, Jul 2014.PMID:24704279.

FRACETO LF. et al. Anestésicos locais: Interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Quim Nova.** v.31, n.7, p. 1775-1783, 2008.

Franz-Montan M et al. Liposomal lidocaine gel for topical use at the oral mucosa: characterization, in vitro assays and in vivo anesthetic efficacy in humans. **J Liposome Res.** v.25, n.1, p.11-9, Mar 2015. PMID:24807821.

Ferreira LEN. **Efeitos dos anestésicos locais associados a carreadores na modulação de mediadores inflamatórios, viabilidade celular e apoptose.** 120 f. Dissertação (doutorado em odontologia) pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, 2014.

FERREIRA LEN, et al. Effects of lidocaine and the inclusion complex with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on cell viability and proliferation of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v.6, Abr 2018.

FLETCHER JM, et al. Cognitive correlates of long-term cannabis use in Costa Rican men. **Arch Gen Psychiatry.** v.53, n.11, p.1051-7, Nov 1996.PMID:8911228.

FRIED, K. et al. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. **Neuroscientist,** v. 7, n. 2, p. 155-165, Apr 2001. ISSN 1073-8584.

GAMBETA E et al. Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **NeurosciLett.** v.21, n.619, p.100-5, Abr 2016.PMID:26952973.

GRANT AS. The holy grail: long-acting local anesthetics and liposomes. **Best PractResClinAnesthesiol.** v.16, n.2, p.345-352, Jun2002. PMID: 12491562.

HAHNENKAMP K, et al., Local anaesthetics inhibit signalling of human NMDA receptors recombinantly expressed in *Xenopuslaevis* oocytes: role of protein kinase C. **Br J Anaesth.** v.96, n.1, p.77-87, Jan 2006.

HILLE B. Ionic Channels of Excitable Membranes, 3rd Ed. *In* Sinauer Associates Inc., 2001.

HOLLMANN MW, DURIEUX ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? **Anesthesiology.** v.93, n.3, p.858-75, Set 2000. PMID: 10969322.

HOLLMANN MW, et al. Inhibition of m3 muscarinic acetylcholine receptors by local anaesthetics. **Br J Pharmacol.**v.133, n.1, p.207–216, 2001.

HUANG J et al. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. **Semin Cell Dev Biol.** v.17, n.6, p.638-45, Dez 2006. PMID: 17185012

HUMMIG, W.; KOPRUSZINSKI, C. M.; CHICHORRO, J. G. Pregabalin Reduces AcuteInflammatory and Persistent Pain Associated with Nerve Injury and Cancer in Rat Models of Orofacial Pain. **Journal of Oral & Facial Pain and Headache,** v. 28, n. 4, p. 350-359, 2014.ISSN 2333-0384.

ISOM LL. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. **Neuroscientist.** v.7, n.1, p.42-54, Fev 2001. PMID: 11486343.

JOO JD, et al. Lidocaine suppresses the increased extracellular signal-regulated kinase/cyclic AMP response element-binding protein pathway and pro-inflammatory cytokines in a neuropathic pain model of rats.**Eur J Anaesthesiol.** v.28, n.2, p.106-11, Fev 2011.PMID:21374892.

KANAI A, et al. Efficacy of a metered-dose 8% lidocaine pump spray for patients with post-herpetic neuralgia.**Pain Med.** v.10, n.5, p. 902-9, Jul 2009.PMID:19682274.

KERN KU, NOWACK W C. Treatment of Neuropathic Pain with the Capsaicin 8% Patch: Is Pretreatment with Lidocaine Necessary?.**PainPract.**v.14, n.2, p.E42–E50, Fev 2014.

KHAWAJA N, etal. Case studies illustrating the management of trigeminal neuropathic pain using topical 5% lidocaine plasters. **Br J Pain.** v.7, n.2, p.107–113, Mai 2013.PMID:26516508.

KISSIN I et al. Effect of prolonged nerve block on inflammatory hyperalgesia in rats: prevention of late hyperalgesia. **Anesthesiology**. v.88, n.1, p.224-32, Jan 1998. PMID: 9447876.

KLAUMANN, P. R. et al. Patofisiologia da Dor. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.13, n.1, p.1-12, 2008.

KOPRUSZINSKI, C. M. et al. Vitamin B complex attenuated heat hyperalgesia following infraorbital nerve constriction in rats and reduced capsaicin in vivo and in vitro effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 326-332, Sep 2015. ISSN: 0014-2999.

KUROIWA DN. et al. Desordens tempomandibulares e dor orofacial: estudo da qualidade de vida medida pelo Medical Outcomes Study 36- Item short form health survey. **Rev. Dor**, v. 12, n. 2, Abr/Jun 2011. ISSN: 1806-0013.

KURKOV SV, LOFTSSON T. Cyclodextrins. **Int J Pharm**. v.453, n.1, p.167-80, Ago 2013. PMID:22771733.

LANG A, et al., Lidocaine inhibits epithelial chemokine secretion via inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B activation. **Immunobiology**. v. 215, n.4, p.304-313, Abr 2010. PMID: 19559500.

LAURETTI GR. Mechanisms of Analgesia of Intravenous Lidocaine. **Rev Bras Anestesiol**. v.58, n.3, p.280-286, Mar 2008. PMID: 19378524.

LIMA RAF, et al., Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrine. **Journal of Drug Targeting**. v. 20, p.85–96, Set 2012. PMID: 22047178

LOFTSSON T, MASSON M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **Int J Pharm**. v.225, p.15-30, Ago 2001. PMID: 11489551.

LOFTSSON T, DUCHÊNE D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int J Pharm**. v.329, p.1-11, Fev 2007. PMID:17137734.

MCLUREHA, RUBIN AP. Review of local anesthetics agents. **Minerva Anestesiol**. v.71, n. 3, p.59-74, Mar 2005. PMID: 15714182.

MCGRATH C, BEDI R. Measuring the impact of oral health on quality of life in Britain using OHQOL-UK (W). **J Public Health Dent**. v.63, n.2, p.73-7, 2003. PMID: 12816136

MELO GM. Terapia farmacológica em disfunções temporomandibulares: uma breve revisão. **Revista Dentística online**. v. 10, n. 21, Abr/Jun 2011. ISSN: 15118- 4889.

Moisés E.C.D. **Estudo farmacocinético e análise da distribuição transplacentária da lidocaína e seu metabólito na assistência via peridural de gestantes diabéticas gestacionais**. 158 f. Dissertação (doutorado em ciências biomédicas) pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo.

Moraes C, et al. Characterization of lidocaine:hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**. v.57, n.4, p.313-316, Abr 2007.

MOTTA EM et al. Role of ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> endothelin receptors on endothelin-1-induced potentiation of nociceptive and thermal hyperalgesic responses evoked by capsaicin in rats. **NeuroscienceLetters**. v.457, n.3, p.146-150, Jul 2009.PMID: 19429182.

NAU C, WANG GK. Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na<sup>+</sup> channels.**JMembr Biol**. v.201, n.1, p.1-8, Set 2004. PMID: 15635807.

NASRI-HEIR C, et al. Burning mouth syndrome: Current concepts.**J Indian Prosthodont Soc**. v.15, n.4, p. 300–307, Out 2015.

NIKI Y, et al. Immediate analgesic effect of 8% lidocaine applied to the oral mucosa in patients with trigeminal neuralgia. **Pain Med**. v.15, n.5, p.826-31, Mai 2014.

Nunes AC. et al. Dor orofacial.**Revista Odontológica de Araçatuba**. v.33, n.1, p.31-35, Jan 2012.

ORLANDO R et al. P450 1A2 is a major determinant of lidocaine metabolism in vivo: effects of liver function. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. v.75, n.1, p.80-88, Jan 2004.

ORTIZ MP, et al. Effect of endovenouslidocaine on analgesia and serum cytokines: double-blinded and randomized trial. **J ClinAnesth**. v.35, p.70-77, Dez 2016.PMID: 27871598.

OLIVEIRA CMB, et al. Lidocaína por Via Venosa Intraoperatória. **RevBrasAnestesiologia**. v.60, n.3, p.325-333, Mai 2010. ISSN 0034-7094.

PEDERSEN PM, et al. Ipsilateral pushing in stroke: incidence, relation to neuropsychological symptoms, and impact on rehabilitation. The Copenhagen Stroke Study.**ArchPhys Med Rehabil**. v.77, n.1, p.25-8, Jan 1996.PMID: 8554469.

PELLISSIER T, et al., The orofacial capsaicin test in rats: effects of diferente capsaicin concentrations and morphine. **Pain** v.96, n.1-2, p.81-87, Mar 2002.Disponívelem: PMID: 11932064.

PINTO LM et al. Physico-chemical characterization of benzocaine-beta-cyclodextrin inclusion complexes.**JPharmBiomed Anal**. v.39, n.5, p.956-63, Out 2005.

RASHEED A, et al. Cyclodentris as drgcarriermolecule: a review. **SciPharm**. v.76, p.567-98, Nov 2008.

RUTSCH YA.et al. From Cocaine to Ropivacaine: The History of Local Anesthetic Drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v.1, n. 3, p.175-182, Ago 2001.PMID:11895133.

Sabatowski R et al. Treatment of postherpetic neuralgia with 5% lidocaine medicated plaster in elderly patients - subgroup analyses from three European clinical trials. **CurrMed Res Opin.** v.33, n.3, p.595-603, Mar 2017.PMID: 1277990.

SAMBROOK PJ, GOSS AN. Severe adverse reactions to dental local anaesthetics: prolonged mandibular and lingual nerve anaesthesia. **AustDent J.** v.56, n.2, p.154-9, Jun 2011.PMID:21623806.

Santos FC. **Intoxicação anestésica: causa, efeito e tratamento.** 27 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação em odontologia) pela Universidade Estadual de Londrina, 2012.

SHEN J, BURGESS DJ. Accelerated in vitro release testing methods for extended release parenteral dosage forms. **J PharmPharmacol.** v.64, p. 986–996, Jul 2012. PMID: 22686344.

SHIKANOV A, et al. Long acting local anesthetic-polymer formulation to prolong the effect of analgesia. **Journal of Controlled Release.** v.117, n.1, p. 97–103, Jan 2007.PMID:17137669.

SHIPTON EA. New formulations of local anaesthetics - part I. **Anesthesiol Res Pract.** v.2012, n.11, p. 546409, 2011. PMID:22190922.

SILVA LFJS. **Nova Associação de Digluconato de Clorexidina e Cloridrato de Lidocaína em Gel Urogenital. Desenvolvimento farmacotécnico, avaliação da qualidade e da estabilidade da formulação.** 176 f. Monografia (mestrado em ciências farmacêuticas) pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SILVA SRC. Dor orofacial e qualidade de vida. **RevOdontoBras Central.** v. 21, n. 56, p. 421-425, 2012. PMID: 1981-3708.

Souza, M. F. **A ação analgésica da lidocaína intravenosa no tratamento da dor crônica: uma revisão de literatura.** 32 f. Monografia (graduação em medicina) pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

Strichartz G, Ritchie J. The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues. In: Strichartz G ed. **Local Anesthetics: Handbook of Experimental Pharmacology**, Vol. 81. Springer-Verlag, Berlin, 1987, p.21-53.

SUZUKI R, et al. Complex of branched cyclodextrin and lidocaine prolonged the duration of peripheral nerve block. **J Anesth.** v.23, n.2, p. 295-7, 2009.PMID:19444576.

TA LE, et al. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. **Mol Pain.** v.5, n.6, p.15, Mar 2010.PMID:20205720.

TAMBURIN S et al. Cognition and emotional decision-making in chronic low back pain: an ERPs study during Iowa gambling task. **Front Psychol.** v.5, p.1350, Nov2014.PMID: 25505440.

TENDER GC, et al. Vanilloid receptor 1-positive neurons mediate thermal hyperalgesia and tactile allodynia. **Spine J.** v.8, n.2, p.351-8, Mar 2008.

TJØLSEN A, et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.** v.51, p.5-17, Out 1992.PMID: 1454405.

UEKAMA K, et al., Cyclodextrin drug carrier systems. **Chem Rev.**v.98, p.2045–2076, Jul 1998.PMID:11848959.

VENTURINI et al. Propriedades e aplicações recentes da ciclodextrina.**Quim.Nova.** v.31, n.2, p.360-368, 2008.ISSN 0100-4042.

VOS BP, et al., Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. **J. Neurosci.** v.14, p.2708-2723, Mai 1994.PMID: 8182437.

WADA H, et al. Combined spinal and general anesthesia attenuates liver metastasis by preserving TH1/TH2 cytokine balance. **Anesthesiology.**v.106, n.3, p. 499–506, 2007. PMID: 17325508.

WAITE, P.; ASHWELL, K. Trigeminal Sensory System.**The Human Nervous System.** p. 1093-124, USA: Elsevier, 2004

WANG SY, et al. Residues in Na(+) channel D3-S6 segment modulate both batrachotoxin and local anesthetic affinities. **Biophys J.** v.79, n.3, p.1379-87, Set 2000.

WANG CF, et al. Prolonged suppression of postincisional pain by a slow-release formulation of lidocaine.**Anesthesiology.** v.114, n.1, p.135–149, Jan 2011.PMID: 21169797.

WEI Y, et al. Masking the bitter taste of injectable lidocaineHCl formulation for dental procedures. **AAPS PharmSciTech.** v.16, n.2, p.455-65, Abr 2015.PMID:25361901.

WILLIAMS HD, et al. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development.**Pharmacol Rev.** v. 65, p.315–499, Jan 2013. PMID: 23383426.

WOOLF CJ, SALTER MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain.**Science.** v. 288, n. 5472 p. 1765-1768, 2000. PMID:10846153.

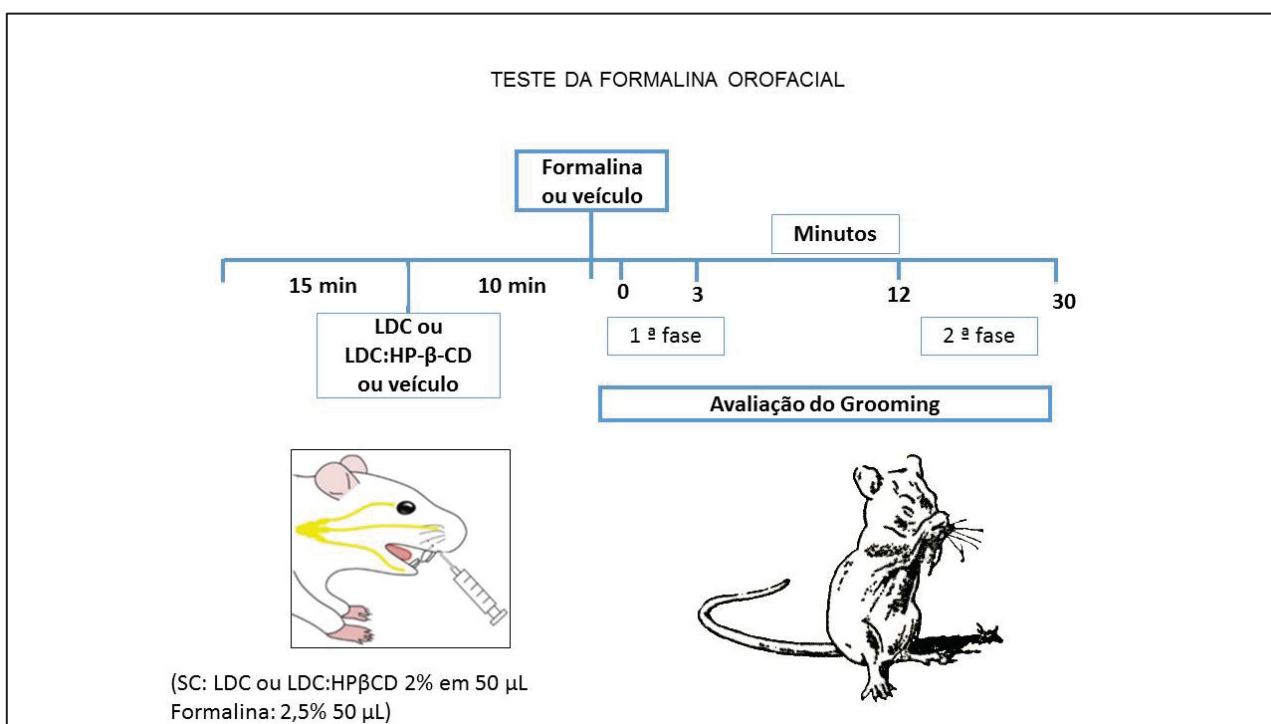
WU Y, et al. Pain aversion and anxiety-like behavior occur at different times during the course of chronic inflammatory pain in rats. **J Pain Res.** v.6, n.10: p.2585-2593, Nov 2017. PMID: 29158690.

YOU P, et al. Design and evaluation of lidocaine- and prilocaine-coatednanoparticulate drug delivery systems for topical anesthetic analgesic therapy: a comparison between solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Drug Design, Development and Therapy.** v.11, p.2743–2752, Set 2017. PMID: 29075099.

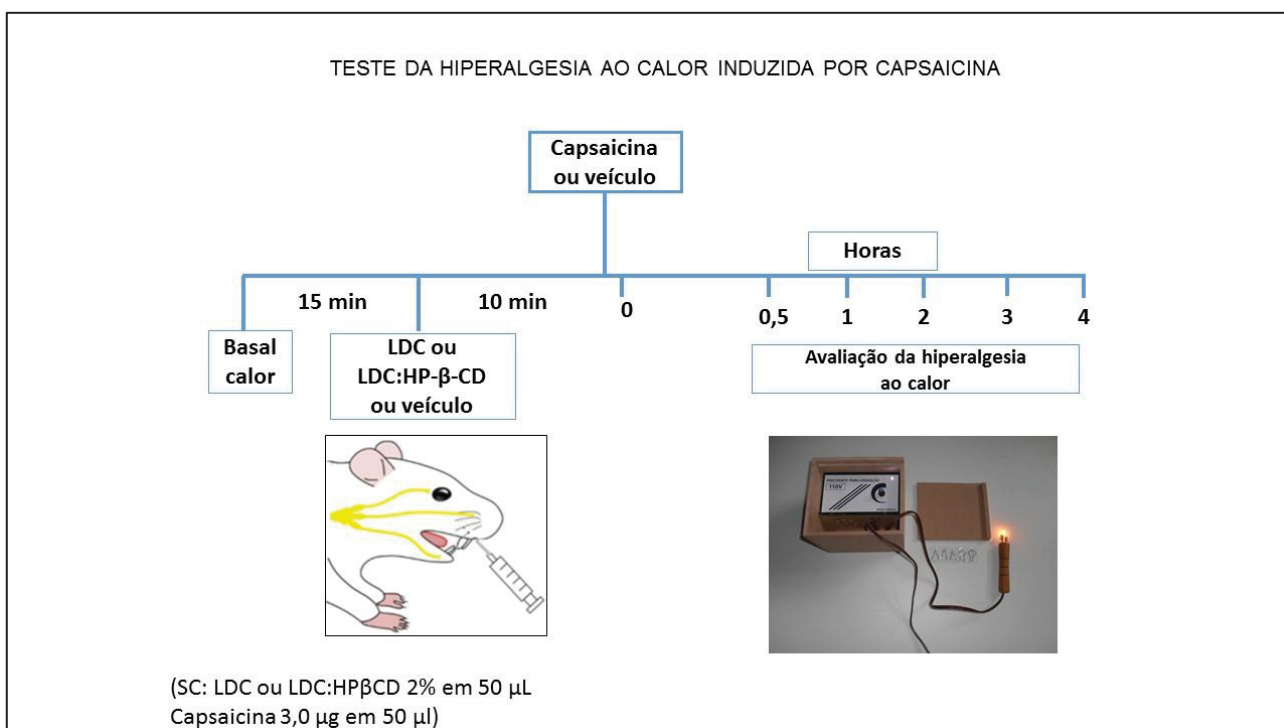
ZAKRZEWSKA JM, et al. Safety and efficacy of a Nav1.7 selective sodium channel blocker in patients with trigeminal neuralgia: a double-blind, placebo-controlled, randomised withdrawal phase 2a trial. **Lancet Neurol.** v.16, n.4, p.291-300, Abr 2017.PMID: 28216232.

## **ANEXOS**

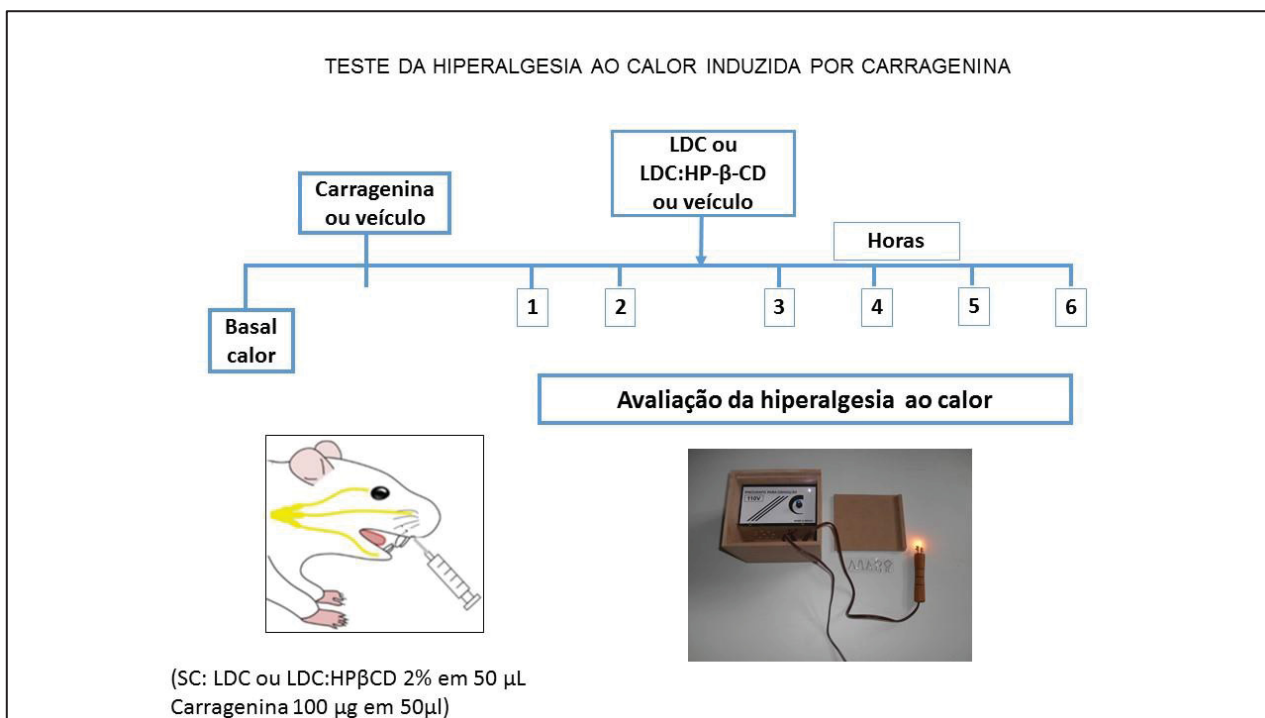
## LINHA TEMPORAL DOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS



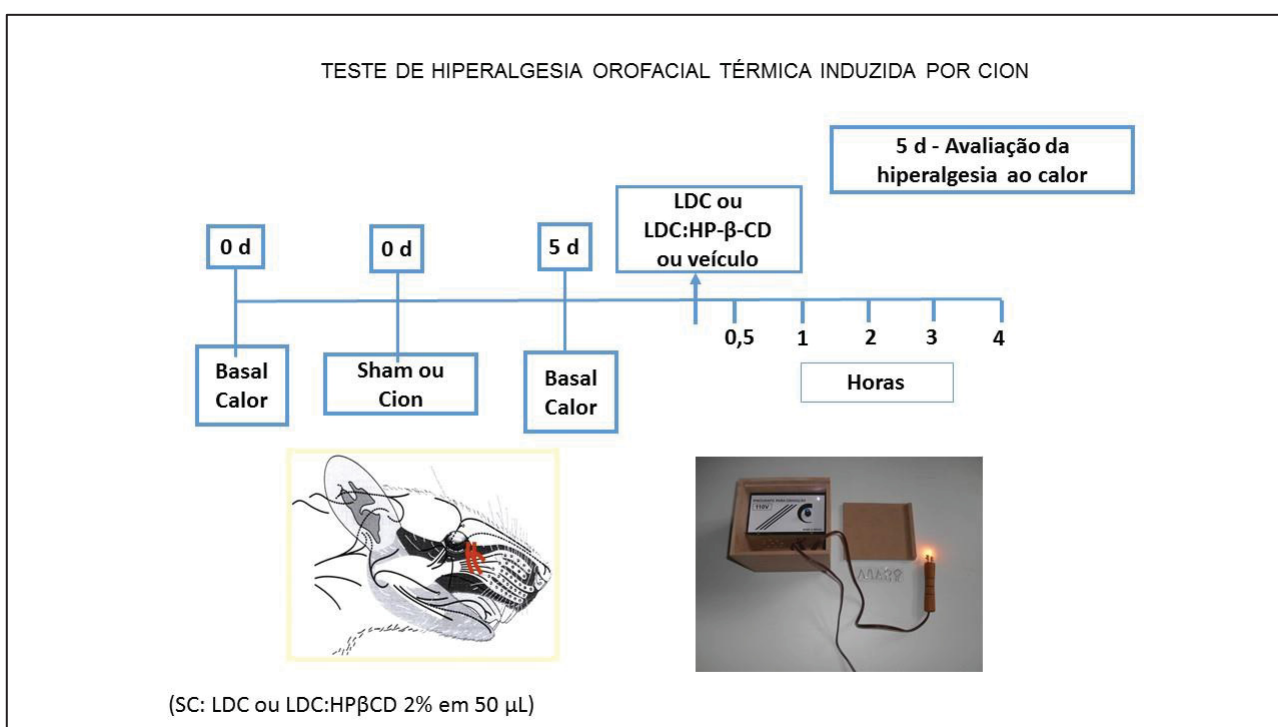
Fonte: O autor, 2018



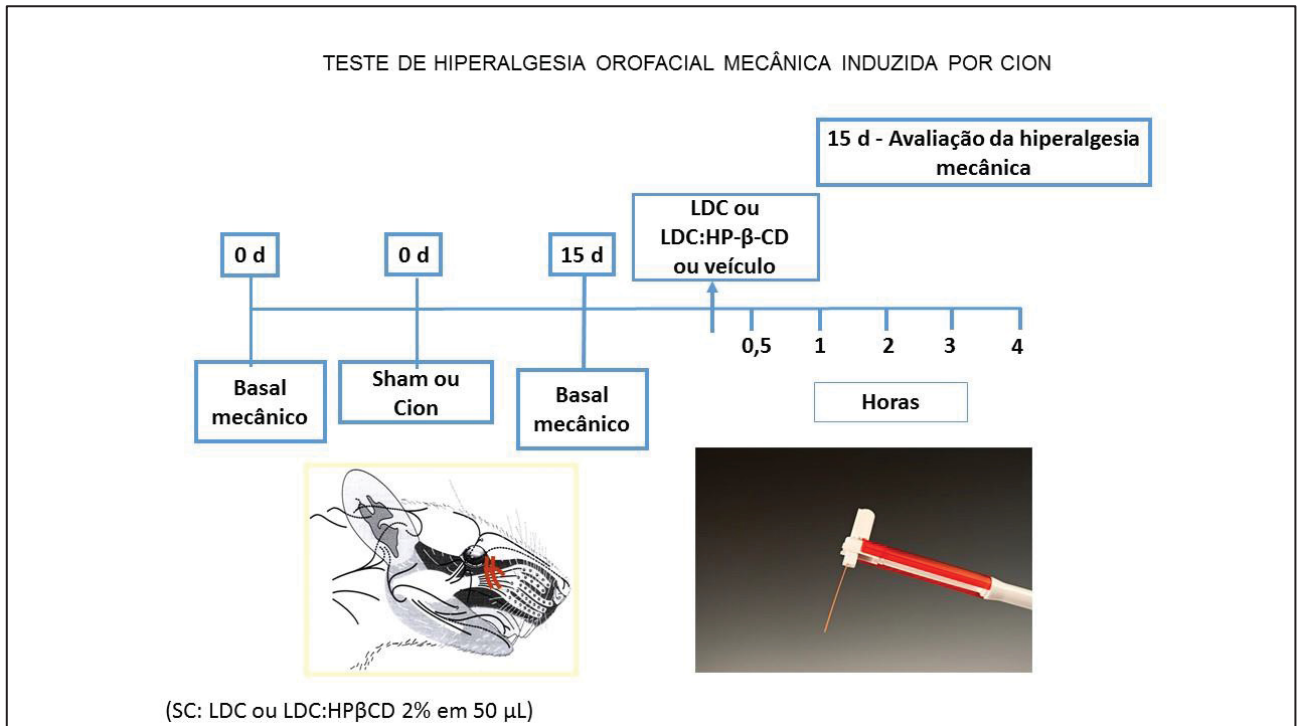
Fonte: O autor, 2018



Fonte: O autor, 2018



Fonte: O autor, 2018



Fonte: O autor, 2018