



JONNY BURGA SÁNCHEZ

“Efeitos da articaína associada a 2-hidroxiopropil- β -
ciclodextrina ou epinefrina sobre a viabilidade celular de
queratinócitos humanos (HaCaT)”

Piracicaba

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

JONNY BURGA SÁNCHEZ

**“Efeitos da articaína associada a 2-hidroxiopropil- β -
ciclodextrina ou epinefrina sobre a viabilidade celular de
queratinócitos humanos (HaCaT)”**

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Co-orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Volpato.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Jonny Burga Sánchez e orientado pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.

Assinatura do orientador

Piracicaba

2014

Unidade BCCL
T/UNICAMP 1391e
Cutter _____
V. _____
Tombo BC 105176
Proc. 16-195-2014
C _____
Preço 11,00
Data 23/09/2014
Cód. tit. 927382

201420543

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

B91e Burga-Sánchez, Jonny, 1974-
Efeitos da articaína associada a 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina ou epinefrina sobre a viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCaT) / Jonny Burga Sánchez. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Coorientador: Maria Cristina Volpato.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carticaína. 2. Hidroxiopropil-beta-ciclodextrina. 3. Epinefrina. 4. Metabissulfito de sódio. I. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. II. Volpato, Maria Cristina, 1962-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of articaine associated to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin or epinephrine on human keratinocyte cell (HaCaT) viability

Palavras-chave em inglês:

Carticaine

Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin

Epinephrine

Sodium metabisulfite

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Francisco Carlos Groppo [Orientador]

Bruno Schneider Herrera

Carina Denny

Data de defesa: 28-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2014, considerou o candidato JONNY BURGA SÁNCHEZ aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "F. Carlos Groppo".

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Bruno Schneider Herrera".

Prof. Dr. BRUNO SCHNEIDER HERRERA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carina Denny".

Profa. Dra. CARINA DENNY

RESUMO

A associação a carreadores tem sido proposta visando prolongar o efeito anestésico, além de reduzir a toxicidade de vários anestésicos locais, incluindo a articaína (ATC). O objetivo do estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da ATC livre ou associada a diferentes concentrações de epinefrina ou 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) sobre a viabilidade celular de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). Foi avaliado também o efeito do metabissulfito de sódio, principal antioxidante e componente das soluções anestésicas comerciais, sobre a viabilidade das citadas células. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar as características físicas dos cristais da ATC, da HP- β -CD e do complexo de inclusão liofilizado de ATC/HP- β -CD. As células HaCaT foram expostas às formulações de ATC em diferentes concentrações desde 0.1% até 4%, associadas ou não a epinefrina 1:50.000, 1:100.000 e 1:200.000, ou em associação com HP- β -CD; em tempos de 10, 30, 60 e 240 min. As células viáveis foram quantificadas pelo método do MTT após os períodos de exposição e comparadas a um grupo controle sem tratamento. A avaliação celular qualitativa foi realizada por microscopia de fluorescência pelo método de coloração Live/Dead[®]. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA (teste de Tukey, $p > 0.05$). Os resultados revelaram que a toxicidade da ATC depende da concentração e do tempo de exposição, sendo que quando complexada com HP- β -CD ou associada à epinefrina 1:200.000, houve tendência a diminuir a toxicidade avaliada inicialmente. Da mesma forma, os adjuvantes como a epinefrina, o metabissulfito de sódio e a HP- β -CD sozinhos mostraram biocompatibilidade nas concentrações empregadas neste estudo. Concluímos que a associação da ATC com a HP- β -CD bem como à epinefrina 1:200.000 diminuiu a toxicidade do anestésico local quando avaliado nas concentrações mais baixas. Entretanto, a associação destes adjuvantes não melhorou o perfil de toxicidade da ATC quando avaliado em concentrações clínicas usuais de 2 e 4%.

Palavras-Chave: Articaína. 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina. Epinefrina. Metabissulfito de sódio. Viabilidade celular. Queratinócitos humanos. Células HaCaT.

ABSTRACT

The association with carriers has been proposed to prolong the anesthetic effect and reduce the toxicity of several local anesthetics including articaine (ATC). The aim of this study was to assess the *in vitro* effect of ATC associated with different concentrations of epinephrine or 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) on cell viability in immortalized human keratinocyte cells cultures (HaCaT). It was also evaluated the effect of sodium metabisulphite, major antioxidant component of commercial anesthetic solutions, on the viability of cited cells. The scanning electron microscopy (SEM) was used to assess the physical characteristics of ATC crystals, HP- β -CD and ATC/HP- β -CD lyophilized inclusion complex. The HaCaT cells were exposed to different formulations of ATC in concentrations from 0.1% to 4%, associated or not with epinephrine 1:50.000, 1:100.000 and 1:200.000, or in formulation with HP- β -CD; in 10, 30, 60 and 240 min time exposure. Vital HaCaT cells were quantified by the MTT method after exposure periods and compared to an untreated control group. Cells were assessed qualitatively by fluorescent microscopy using the staining Live/Dead[®] method. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA (Tukey test, $p > 0.05$). The results showed that toxicity of ATC depends on the concentration and exposure time, and when complexed with HP- β -CD or associated with epinephrine 1:200.000, there was a tendency to decrease the toxicity initially evaluated. Likewise, adjuvants such as epinephrine, sodium metabisulphite and HP- β -CD alone showed biocompatibility in concentrations used in this study. In conclusion, the association of ATC with HP- β -CD as well as epinephrine 1:200.000 decreased local anesthetic toxicity when lower concentrations of ATC are used. However, the combination of adjuvants did not improve the toxicity profile of ATC when used in clinical usual concentrations of 2 and 4%.

Key-words: Articaine. 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Epinephrine. Sodium metabisulfite. Cell viability. Human keratinocytes. HaCaT cells.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| SUMÁRIO | viii |
| Lista de abreviaturas, siglas e símbolos. | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Breve resenha histórica da anestesia local | 3 |
| 2.2 Mecanismo de ação dos anestésicos locais | 3 |
| 2.3 Moléculas dos anestésicos locais | 4 |
| 2.4 Farmacologia da articaína | 5 |
| 2.5 Vasoconstritores e antioxidantes associados a anestésicos locais | 6 |
| 2.5.1 Epinefrina e outros vasoconstritores | 6 |
| 2.5.2 Metabissulfito/bissulfito de sódio | 8 |
| 2.6 Mecanismos de toxicidade dos anestésicos locais | 10 |
| 2.6.1 Toxicidade sistêmica e citotoxicidade | 10 |
| 2.6.2 Modificação do processo inflamatório | 12 |
| 2.6.3 Indução da apoptose e necrose celular | 14 |
| 2.7 Ciclodextrinas e complexos de inclusão com anestésicos locais | 15 |
| 3. PROPOSIÇÃO | 20 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 4.1 Células HaCaT, formulações anestésicas e reagentes | 21 |
| 4.2 Avaliação da formação do complexo de inclusão ATC/HP- β -CD por microscopia eletrônica de varredura | 22 |
| 4.3 Cultura celular | 22 |
| 4.4 Condições experimentais | 22 |
| 4.5 Avaliação da viabilidade celular – MTT | 23 |
| 4.6 Análise da citotoxicidade por microscopia de fluorescência | 24 |
| 4.7 Forma de análise dos resultados | 24 |
| 5. RESULTADOS | 25 |

| | |
|---|----|
| 5.1 Microscopia eletrônica de varredura | 25 |
| 5.2 Viabilidade celular – MTT | 26 |
| 5.3 Viabilidade/citotoxicidade celular – Live/Dead® | 30 |
| 6. DISCUSSÃO | 32 |
| 7. CONCLUSÃO | 39 |
| REFERÊNCIAS | 40 |

Dedicado a todos os homens e mulheres de ciência que acreditam em um mundo melhor. A minha família por acreditar, apoiar e motivar meu desenvolvimento. A minha esposa, fonte da minha inspiração e melhor amiga. Aos meus amigos, novos amigos e professores da FOP/UNICAMP com os quais venho convivendo nesses últimos anos e com quem compartilhamos a nossa paixão pela ciência e a odontologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP) na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, pela grande oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenadoria do Programa de Pós-graduação em Odontologia, representada pela Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchouri e à equipe de professores adjuntos por viabilizarem a realização da pós-graduação

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e a Profa. Dra. Maria Cristina Volpato pela orientação, paciência, disponibilidade e apoio constante durante a pesquisa.

Aos demais docentes, pessoal técnico do laboratório, aos amigos e colegas de laboratório por todo o suporte e atenção fornecidos neste tempo para atingir os objetivos deste trabalho.

À minha esposa Rosa Abuhadba pela compreensão e ajuda constante. A todos meus amigos e familiares pelo interrupto apoio tanto nos momentos de alegria quanto nas dificuldades nestes dois anos de mestrado.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.

| | |
|--------------------|---|
| ANOVA: | análise de variância. |
| APS: | American Pain Society (Sociedade Americana da Dor) |
| Ca ²⁺ : | íon cálcio. |
| CD: | ciclodextrinas. |
| °C: | grau centígrado. |
| DMEM: | Dubelco's Modified Eagle's Medium (meio de Eagle modificado por Dubelco) |
| IPEC-1: | Intestinal Porcine Epitelial Cell type 1 (célula intestinal de porco tipo 1) |
| IPEC-2: | Intestinal Porcine Epitelial Cell type 2 (célula intestinal de porco tipo 2) |
| ELISA: | Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio imunossorvente ligado a enzima) |
| EthD-1: | Ethidium homodimer-1 (homodimero-1 de Etídio) |
| FBS: | Fetal bovine serum (soro fetal bovino) |
| h: | hora |
| H ⁺ : | íon hidrogênio |
| HaCaT: | Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes (linagem de queratinócitos adultos humanos imortalizados) |
| HP-β-CD: | 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina ou BCD. |
| IFDAS: | International Federation of Dental Anesthesiology Societies (Federação Internacional das Sociedades de Anestesiologia Dental) |
| K ⁺ : | íon potássio. |

| | |
|--------------------|--|
| CL ₅₀ : | Concentração letal média |
| C _{max} : | Concentração máxima |
| MEV: | microscópio eletrônico de varredura |
| min: | minuto |
| mL: | mililitro |
| MTT: | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo] |
| Na ⁺ : | íon sódio |
| NaCl: | cloreto de sódio |
| PA: | Para análise |
| PBS: | phosphate-buffered saline (solução salina tamponada com fosfato) |
| PBMC: | Porcine Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células mononucleares de sangue periferica de porco) |
| T _{max} : | tempo de concentração máxima |
| USP: | United State Pharmacopeia (Farmacopeia dos Estados Unidos) |
| WTS-1: | Water Tetrazolium Salt (Sal Tetrazolio em Agua) |

1. INTRODUÇÃO

Considerada pela ASP como o “quinto sinal vital” (Department of Veterans Affairs, 2000), a dor sempre tem motivado pesquisas na busca de novos agentes analgésicos cada vez mais seguros e menos tóxicos. Para a sua prevenção ou controle, empregam-se uma variedade grande de medicamentos, dentro deles os anestésicos locais.

Os anestésicos locais são fármacos que impedem a condução dos impulsos elétricos nociceptivos reversivelmente, gerando uma perda da sensibilidade à dor (Drasner, 2009). Geralmente a injeção de anestésicos locais é efetiva e segura, mas o uso de doses excessivas ou aplicação intravascular inadvertida podem produzir reações adversas como toxicidade ao sistema nervoso central e cardiovascular (Mercado & Weinberg, 2011; Baluga, 2003; Rood, 2000; Chen, 1998). Tonturas, confusão, inquietação, convulsões, desmaio, arritmias, taquicardia, hipertensão e metemoglobinemia são algumas manifestações adversas resultantes da ação sistêmica dos anestésicos locais (Moore & Hersh, 2010; Lukawska *et al.*, 2009; McLure & Rubin, 2005; Cassedy *et al.*, 1986).

Além disso, os anestésicos locais podem exercer uma grande variedade de efeitos sobre diferentes tipos celulares podendo interferir em processos de cicatrização, resposta inflamatória e também causar toxicidade celular (Hollmann & Durieux, 2000). Recentemente a segurança dos anestésicos locais tem sido questionada, onde se tem verificado sua ação citotóxica, através de necrose e indução de apoptose em diversos tipos celulares (Ballieul, 2009). Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar o efeito citotóxico dos anestésicos locais, tais como: induzir o colapso das membranas mitocondriais, causar bloqueio prolongado dos canais de potássio e alterar homeostase do cálcio (Jacobs *et al.*, 2011; Grishko *et al.*, 2010; Perez-Castro *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2000).

A articaína, anestésico local de tipo amida, vem sendo apontada como um dos anestésicos mais potentes e com menor toxicidade dentre aqueles utilizados em odontologia (Pellicer-Chover *et al.*, 2013; Kambalimath *et al.*, 2013; Tortamano *et al.*, 2013). No entanto, esta amida anestésica tem sido sujeita a muita discussão em odontologia, pois, a despeito da elevada taxa de sucesso anestésico (Kämmerer *et al.*, 2013; Paxton *et al.*, 2010), inclusive por

infiltração na mandíbula (El-Kholey, 2013; McEntire *et al.*, 2011; Batista da Silva *et al.*, 2010; Meechan, 2010), vem apresentando relatos de risco aumentado de parestesia (Pogrel, 2012; Moore & Haas, 2010; Moore & Hersh, 2010; Garisto *et al.*, 2010). Alterações de sensibilidade e dor pós-operatória transitória, também foram relatadas, sendo a função sensória usualmente recuperada de forma rápida (Malamed *et al.*, 2001). Agentes em alta concentração, tais como soluções de prilocaína ou articaína a 4%, são significativamente mais propensas a causar parestesias ou lesões nervosas prolongadas ou permanentes quando administrados para bloqueio do nervo alveolar inferior (Hass, 2006; Hass & Lennon, 1995).

A articaína é comercializada em concentração de 4% sempre associada com epinefrina (adrenalina). Pouca atenção tem sido dada a possível toxicidade da epinefrina comumente associada aos anestésicos locais. Estas associações, que apresentam um pH ácido, demandam a adição de pelo menos um agente antioxidante, devido à alta taxa de oxidação deste vasoconstritor, causada por vários fatores tais como luz, calor, metais pesados e aumento do pH (Trissel, 2011; Cartwright & Fyhr, 1988; Toma & Strure, 1986; Kelly & Dalm, 1985; Milano *et al.*, 1982; Sixsmith *et al.*, 1982; Lintner, 1980). Assim, o pH ácido destas soluções pode ser uma fonte de toxicidade celular.

Na procura de uma molécula para anestesia local ideal, novas formulações anestésicas vêm sendo desenvolvidas utilizando carreadores, tais como lipossomos e ciclodextrinas, com o objetivo de prolongar o efeito dos anestésicos locais, melhorar a solubilidade e reduzir a sua toxicidade (Shipton, 2012; de Paula *et al.*, 2010; Grant & Bansinath, 2001).

As chamadas ciclodextrinas são cadeias cíclicas contendo um número variado de unidades de glicoses ligadas. Estes carreadores são capazes de melhorar algumas propriedades físico-químicas de fármacos (Araújo *et al.*, 2006) tais como a solubilidade aquosa, otimizando o efeito terapêutico) e a farmacocinética (absorção, biodisponibilidade e distribuição pelos tecidos) (Loftsson & Duchene, 2007; Dollo *et al.*, 2000).

Desta maneira, o presente estudo avaliou os efeitos de várias concentrações de articaína livre, associada à epinefrina ou complexada com HP- β -CD; assim também ao metabissulfito de sódio, sobre a viabilidade celular de queratinócitos humanos (HaCaT).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve resenha histórica da anestesia local

O primeiro anestésico local descoberto foi a cocaína por Albert Nieman em 1859; mas o início da era da anestesia local aconteceu em 1884, quando foi utilizada clinicamente com sucesso por Carl Koller. Porém o entusiasmo inicial foi logo superado pelos relatos de efeitos tóxicos e eventuais mortes (Gröger & Schmidt-Wyklicky, 2012). De fato, a farmacodependência já na década de 1920, fez a cocaína a mais temida de todas as drogas ilícitas (Das, 1993).

Em 1905, a anestesia local volta a crescer em popularidade com a introdução da procaína sintetizada por Alfred Einhorn e colaboradores. Infelizmente, o fraco efeito anestésico e os altos índices de reações anafiláticas associados aos anestésicos locais do tipo éster limitaram o seu uso (Yagiela *et al.*, 2011).

A anestesia local e regional moderna tem início com a introdução dos anestésicos locais do grupo amida, primeiramente com a lidocaína em 1943 e mais tarde com a bupivacaína (Wiles & Nathason, 2010). Desde esse momento até hoje os anestésicos locais são os fármacos mais comumente administrados na prática odontológica (Sambrook & Goss, 2011), se constituindo em uma das estratégias mais comuns para o controle da dor durante e depois dos procedimentos cirúrgicos (de Paula *et al.*, 2012).

2.2 Mecanismo de ação dos anestésicos locais

Os anestésicos locais atuam na membrana celular impedindo a geração e condução dos impulsos nervosos. Bloqueiam a condução diminuindo ou prevenindo o aumento transitório da permeabilidade de Na⁺ das membranas excitáveis que é normalmente produzido por uma ligeira despolarização da membrana (Strichartz & Ritchie, 1987).

Essa ação dos anestésicos locais é devido a sua interação direta com os canais de Na⁺ voltagem-dependentes. Como a ação anestésica se desenvolve progressivamente num nervo, o limiar para excitabilidade elétrica aumenta gradualmente, a taxa de potenciais de ação enfraquece e a condução do impulso diminui. Estes fatores diminuem a probabilidade de propagação do

potencial de ação, e a condução do nervo eventualmente falha (Brunton *et al.*, 2011).

As moléculas dos anestésicos locais em seu estado básico não ionizado entram por difusão ao citoplasma da célula nervosa e, internamente, sofrem um processo de ionização. Deste modo essas moléculas obtêm acesso ao seu sítio de ligação no interior do canal quando o canal de Na⁺ está no estado aberto e, porque elas se ligam com maior afinidade estabilizando o estado inativo do canal de Na⁺ (Butterworth & Strichartz, 1990; Strichartz & Ritchie, 1987; Courtney & Strichartz, 1987).

Os canais de Na⁺ voltagem-dependentes dos mamíferos são proteínas glicosiladas complexas. O canal é formado por duas subunidades β (β₁ e β₂) e uma grande subunidade α central. A subunidade α é o sítio de ligação para os anestésicos locais e contem quatro domínios homólogos (I, II, III e IV); cada domínio é, por sua vez, formado por seis segmentos transmembranares na conformação de alfa hélice (S1 a S6). O poro seletivo transmembranar de Na⁺ está no centro de uma estrutura quase simétrica formada pelos quatro domínios homólogos (Catterall, 2000). Os resíduos de aminoácidos importantes para a ligação dos anestésicos locais se encontram no segmento S6 dos domínios I, III e IV (Yarov-Yarovoy *et al.*, 2002). Em concentrações mais elevadas, os anestésicos locais se ligam a outras proteínas de membrana, em particular, podem bloquear os canais de K⁺, embora isto não gere uma alteração significativa no potencial de membrana neuronal (Butterworth & Strichartz, 1990).

2.3 Moléculas dos anestésicos locais

Na molécula dos anestésicos locais é possível distinguir três frações: Um núcleo aromático que é primariamente responsável pela solubilidade lipídica do fármaco, derivado do ácido benzoico, da anilina ou do tiofeno (na articaína). Adicionando mais grupos a este nível aumenta a lipofilicidade do composto. A parte hidrófila é um aminoderivado do álcool etílico ou do ácido acético. Determina a solubilidade da molécula e o seu grau de ligação às proteínas do plasma. Assim, todos os anestésicos locais são anfipáticos, ou seja, possuem características lipofílicas e hidrofílicas, em geral nas extremidades da molécula. A estrutura do anestésico se completa por uma

cadeia de hidrocarboneto intermediária contendo uma ligação de éster ou de amida, o que determina a sua classificação (Malamed, 2004).

Na atualidade, os anestésicos locais do tipo amida, como a lidocaína, mepivacaína, prilocaina, ropivacaina e articaína, são os mais empregados na medicina e na odontologia (Yagiela *et al.*, 2011; Malamed, 2004)

2.4 Farmacologia da articaína

No grupo das amidas, a articaína, originalmente sintetizada como carticaína, entrou na prática odontológica em 1973 (Ferber & Marxkors, 1973). Em 1984 foi lançada no Canadá, seguida pelo Reino Unido em 1998, o resto da Europa e os EUA em 2000, e na Austrália, em 2005. Atualmente, a articaína 4% com epinefrina 5 µg/mL é amplamente utilizada em Odontologia (Snoeck, 2012).

A articaína (4-metil-3-[2-(propilamino)-propionamido]-2-tiofeno-carboxílico, cloridrato do éster metílico), difere dos outros anestésicos locais do tipo amida, porque contém um anel de tiofeno. O anel de tiofeno permite uma maior solubilidade lipídica, o que facilita a difusão através da membrana nervosa rica em lipídeos para aceder aos receptores alvos (McLure & Rubin, 2005).

Além disso, a articaína contém um grupo éster no anel tiofeno, de modo que a hidrólise ocorre no plasma por colinesterases inespecíficas, formando ácido articaínico (metabolito inativo), o qual é parcialmente metabolizado no rim em ácido articaínico glucuronídeo, e por fim eliminado por esta via. (Snoeck, 2012; Mojumdar & Lyubartsev, 2010; Vree & Gielen, 2005).

A articaína bloqueia a condução nervosa por ligação reversível a subunidade α dos canais de sódio dependentes de voltagem dentro da cavidade interna do nervo, semelhante a outros anestésicos locais (Snoeck, 2012).

A articaína é lipossolúvel, altamente ligada às proteínas plasmáticas (94%), e tem uma constante de dissociação (pKa) de 7.8 (Mather & Tucker, 2009). É um anestésico local de potência intermediária, de curta duração com um rápido início de ação (McLure & Rubin, 2005). Quando administrada com epinefrina 1:100.000 ou 1.200.000 atinge um Tmax = 22 minutos e um tempo de meia vida de 44 minutos, aproximadamente (Hersh *et al.*, 2006)

A articaína, como a maioria dos anestésicos locais em concentrações que são utilizados clinicamente, tem um efeito vasodilatador, o que aumenta a sua absorção sistêmica. As preparações com epinefrina 1:60.000, 1:100.000 e 1:200.000 (5 µg/mL), diminuem este efeito (Sack & Kleemann, 1992).

2.5 Vasoconstritores e antioxidantes associados a anestésicos locais

2.5.1 Epinefrina e outros vasoconstritores

A adição de um vasoconstritor na solução anestésica retarda a absorção do fármaco, diminui a toxicidade sistêmica do anestésico local, prolonga a duração do efeito e gera um sangramento cirúrgico menor devido ao seu efeito vasoconstrictor (Volpato, 2006).

Os vasoconstritores empregados nas soluções anestésicas são as aminas simpaticomiméticas adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina ou levarterenol), levonordefrina (corbadrina), fenilefrina, e o análogo sintético do hormônio antidiurético vasopressina, felipressina (Malamed, 2004).

As aminas simpaticomiméticas agem sobre os receptores celulares adrenérgicos alfa (α), que apresenta dois subtipos α_1 e α_2 ; e beta (β), que apresenta três subtipos β_1 , β_2 e β_3 . A ação vasoconstritora é exercida pela interação com os receptores α_1 (Ranali & Volpato, 2013; Malamed, 2004).

A levonordefrina e a noradrenalina possuem apenas 20% e 30% da potência vasoconstritora da adrenalina, respectivamente. Por isso que a sua concentração em anestésicos dentários é até cinco vezes maior (1:20.000 para a levonordefrina e 1:30.000 para a noradrenalina) que a concentração mais comum de epinefrina (1:100.000) (Malamed, 2004; Rose *et al.*, 2002).

As recomendações vigentes da IFDAS sugerem que a noradrenalina seja eliminada como vasoconstritor nos anestésicos locais odontológicos (Jackob, 1989). Assim, o uso de noradrenalina e levonordefrina em odontologia está se tornando mais restrito ou mesmo suprimido em pacientes hipertensos, porque eles produzem ativação descompensada do receptor α_1 (Malamed, 2004; Little, 2000). Considerando os aspectos anteriores, alguns autores tem recomendado contraindicar o uso de anestésicos locais com vasoconstritor em

determinadas condições clínicas (Dias de Andrade *et al.*, 2006; Little *et al.*, 2002; Perusse *et al.*, 1992).

A segurança no uso do vasoconstritor epinefrina nas soluções anestésicas em odontologia tem sido demonstrada em pacientes saudáveis e com certas doenças sistêmicas (Elad *et al.*, 2008; Tily & Thomas, 2007); sendo o agente mais utilizado e de escolha para procedimentos odontológicos de rotina em pacientes saudáveis, incluindo mulheres grávidas, crianças e idosos (Ranali & Volpato, 2013).

De fato, tem sido demonstrado os benefícios substanciais deste vasoconstritor no sucesso anestésico local por infiltração de articaína utilizando diferentes concentrações de epinefrina (Kämmerer *et al.*, 2013a).

Utilizando uma mesma concentração de epinefrina (1:100.000) nas soluções anestésicas, Kambalimath *et al.*, (2013) demonstraram que a articaína 4% oferece melhor desempenho clínico que a lidocaína 2%, principalmente no tempo de latência e duração do efeito anestésico.

Santos *et al.*, (2007) demonstraram que uma concentração de 1:100.000 ou 1:200.000 na solução de articaína 4%, não afeta a eficácia clínica deste anestésico local na extração de terceiros molares com ou sem remoção óssea, sugerindo o uso de uma menor concentração deste vasoconstritor na clínica odontológica.

Devido à alta eficácia, tolerância e segurança, a solução de articaína 4% com uma concentração de epinefrina reduzida (1:400.000) foi uma droga segura e adequada para o tratamento odontológico de rotina em pacientes pediátricos (Kämmerer *et al.*, 2013b).

Além disso, com a finalidade de avaliar possíveis mudanças histológicas e/ou funcionais, Komatsu *et al.*, (2013) mostraram que a epinefrina 0.1 mg/mL ou 0.5 mg/mL administrada por via intratecal prolonga a ação da lidocaína, mas não piora a neurotoxicidade produzida pela lidocaína a 5% ou 7% em ratos. Embora a concentração de epinefrina utilizada neste estudo foi de 10 a 50 vezes maior do que a concentração mais comumente empregada nas soluções anestésicas em odontologia (10 µg/mL); sugere a biocompatibilidade da epinefrina ainda em altas concentrações.

No entanto, Baroni *et al.*, (2013) observaram que a epinefrina administrada em concentração de 1:100.000 produz uma infiltração inflamatória

intensa sobre o nervo mentoniano em ratos, quando administrada sem anestésico local. Embora no estudo histopatológico não fosse observado dano na estrutura nervosa, a infiltração inflamatória poderia ser explicada pela hipóxia gerada pela intensa vasoconstrição não compensada no tecido conectivo.

Por outro lado, Lai *et al.*, (2009) mostraram que a exposição de fibroblastos cardíacos de ratos a uma dose de 100 μ M (equivalente a 16,9 mg/L) de norepinefrina (noradrenalina) durante 48 h, causou citotoxicidade e apoptose significativas nessas células. O processo de apoptose verificado envolvia a ativação da caspase-3. É importante ressaltar que a concentração de norepinefrina utilizada por aqueles autores é menor do que a usualmente empregada para esse vasoconstritor em Odontologia (1:50.000 ou 20 mg/L). Assim, é possível que o vasoconstritor seja uma importante fonte de toxicidade celular.

O estudo de Liu *et al.*, (2004) mostrou que fios de retração gengival impregnados com epinefrina em contato com fibroblastos gengivais humanos durante 10 min ou 24 h inibiram quase que completamente a viabilidade celular, mostrando alta toxicidade celular, sendo que esse fenômeno foi dependente do tempo de exposição.

Dragoo *et al.*, (2010) mostraram que a grande toxicidade causada por anestésicos locais contendo epinefrina em condrócitos pode ser atribuída à combinação do baixo pH e substâncias como o metabissulfito de sódio, principal agente antioxidante empregado nas soluções anestésicas.

2.5.2 Metabissulfito/bissulfito de sódio

O metabissulfito de sódio, antioxidante mais empregado nos tubetes de anestesia local, evita a oxidação do vasoconstritor pelo oxigênio, que poderia estar presente no tubete durante a fabricação ou poderia ter difundido através do diafragma semipermeável depois do enchimento (Lukawska *et al.*, 2009; Malamed, 2004).

Empregado nos tubetes de anestesia local numa concentração de 0.375 mg/mL a 0.55 mg/mL (Lukawska *et al.*, 2009; Hondrum & Ezell, 1996), o metabissulfito/bissulfito de sódio reage com o oxigênio antes que este seja capaz de destruir o vasoconstritor. O metabissulfito de sódio é oxidado a

metabissulfato/bissulfato de sódio o que gera uma liberação de prótons, resultando numa diminuição do pH ainda mais baixa. (Malamed, 2004; Fyhr & Broding, 1987). Além disso, sabe-se que a sensibilidade ao sulfito afeta principalmente a um subgrupo da população asmática (Lukawska *et al.*, 2009).

A USP exige que o pH deva estar dentro de 3.3 a 5.5 para preparações de anestesia dental contendo vasoconstrictores (USP, 1990), devido a instabilidade da epinefrina em pH maior. De fato, a epinefrina torna-se mais instável na medida em que o pH se incrementa (Sixsmith *et al.*, 1982; Hajratwala, 1975): em pH 4.5, as concentrações de epinefrina caem abaixo dos níveis mínimos dos recomendados pela USP em menos de 12 meses (Toma & Strure, 1986); acima de pH 6, a epinefrina começa a se deteriorar dentro de várias horas (Trissel, 2011).

Devido à subestrutura catecol, as moléculas de epinefrina e norepinefrina podem facilmente sofrer processos de oxidação (Hoellein & Holzgrabe, 2012). Para estabilizar as aminas simpatomiméticas, os fabricantes acidificam as suas preparações anestésicas locais, normalmente com ácido clorídrico, e incluem um tampão (Lintner, 1980); já que ocorrem tanto oxidação e racemização de forma retardada (Hoellein & Holzgrabe, 2012). Para uma estabilidade ótima, a faixa do pH para epinefrina de 3 a 4 e de 3.6 a 6 para norepinefrina é recomendada (Trissel, 2011).

Gissen *et al.*, (1986, 1984) usando um modelo de nervo vago isolado de coelho, encontraram que a exposição a cloroprocaína 3% com bissulfito de sódio a 0.2% a pH 3 produz falha irreversível na condução nervosa, porém usando a mesma solução tamponada a pH 7.3 resultou numa recuperação da condução. O bloqueio irreversível também ocorreu com bissulfito de sódio sem cloroprocaína, mas a pH baixo, sugerindo que a liberação de dióxido de enxofre foi a etiologia da lesão nervosa.

No entanto, o bissulfito de sódio 0.2%, com pH = 3, não produz dano morfológico ou deficiência funcional quando administrado por via intratecal (Taniguchi *et al.*, 2004). Além disso, os autores desta pesquisa sugerem que o bissulfito poderia reduzir o dano neurotóxico induzido pelos anestésicos locais.

Similares resultados ao anterior foram encontrados por Kalichman *et al.*, (1986) quem demonstraram que o edema endoneural produzido pelo

bissulfito de sódio, ainda com pH 3, foi similar ao grupo controle (solução salina).

Ford & Raj, (1987) e Hersh *et al.*, (1990) encontraram que a condução nervosa não foi afetada por exposição a bissulfito 0.2% e só foi afetada quando administrado em concentrações pelo menos 3 vezes maior; sugerindo que a neurotoxicidade do bissulfito é concentração dependente.

2.6 Mecanismos de toxicidade dos anestésicos locais

2.6.1 Toxicidade sistêmica e citotoxicidade

No contexto geral, o efeito clínico dos anestésicos locais, assim como alguns efeitos colaterais especialmente no sistema cardiovascular e o sistema nervoso central, é devido à interação com locais específicos nos canais de sódio voltagem dependentes (Shipton, 2012; Nau & Wang, 2004).

No entanto, os anestésicos locais não só bloqueiam canais de Na⁺, já que também possuem a capacidade de bloquear canais de Ca²⁺, K⁺ (Wang *et al.*, 2011; Xion & Strichartz, 1998; Guo *et al.*, 1991), receptores de potencial transitório vaniloides tipo 1 (Hirota *et al.*, 2003), e outros receptores operados por ligando. Os anestésicos locais podem também interromper o acoplamento entre algumas proteínas G aos seus receptores associados (Hollman *et al.*, 2005; de Paula & Schreier, 1996). Através desta ação, os anestésicos locais exercem efeitos anti-inflamatórios potentes, em particular sobre reações iniciadoras de neutrófilos (Hollman *et al.*, 2001).

Aparentemente os mecanismos pelos quais essas moléculas exercem efeitos citotóxicos não estão relacionados com o seu papel no bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes (Grishko *et al.*, 2010; Kamiya *et al.*, 2005). As moléculas dos anestésicos locais interagem com os fosfolipídios das membranas celulares resultando em uma desregulação da atividade de enzimas como a proteína kinase C, fosfolipase A₂ e com o metabolismo energético da mitocôndria, além de interferir em outras vias de comunicação celular (Szewczyk & Wojtczak, 2002).

Numerosos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de estudar os efeitos celulares dos anestésicos locais, utilizando distintos tipos de células. Alguns destes estudos demonstraram que os anestésicos locais, incluindo a lidocaína, são capazes de induzir alterações de conformação do citoesqueleto

de fibroblastos (Pierzchalska *et al.*, 1998) e eritrócitos (Nishiguchi *et al.*, 1995); alterações na proliferação de células epiteliais da córnea (Hirata *et al.*, 2004) e fibroblastos de pulmão (Nishina *et al.*, 2002); e alterações na viabilidade celular em condrócitos articulares humanos (Jacobs *et al.*, 2011), células de linfoma (Werdehausen *et al.*, 2007), células de neuroblastoma (Werdehausen *et al.*, 2009), células de Schwann e neurônios (Johnson *et al.*, 2004). Da mesma forma, Grouselle *et al.* (1990) mostraram que os anestésicos locais altamente lipossolúveis podem chegar a mitocôndria e modificar o potencial de membrana de fibroblastos 3T3, e estudos recentes realizados por Villarruel *et al.* (2011) demonstraram que a lidocaína é capaz de estimular apoptose de fibroblastos gengivais humanos.

A neurotoxicidade local produzida pelos anestésicos locais é um fenômeno conhecido o qual é determinado pela lipofilicidade. No estudo *in vitro* de Werdehausen *et al.* (2012) demonstraram que a citotoxicidade sob células de linfoma T (Jurkat) produzida por oito diferentes anestésicos locais, dentro deles a articaína, foi concentração-depende. A apoptose foi observada com concentrações baixas dos anestésicos locais, enquanto a necrose com concentrações maiores. Os valores de LC₅₀, após 24 h de tratamento, dos diferentes anestésicos locais rendeu a seguinte ordem decrescente de toxicidade: tetracaína, bupivacaína, ropivacaína, prilocaína, lidocaína, articaína e mepivacaína; sugerindo a articaína como um dos anestésicos com menor efeito citotóxico sobre aquela linhagem celular.

Em um recente estudo, Oliveira *et al.* (2014) avaliaram a citotoxicidade precoce e tardia produzida por diferentes concentrações de uma formulação comercial de lidocaína 2% contendo epinefrina 1:100.000 sobre fibroblastos de mucosa oral expostos por 30 min, 1, 6, 12, 24 e 48 h. Avaliaram a função celular ao nível mitocondrial e citoplasmática usando como reagentes a calceína/homodímero-1 de Etídio e MTT/WST-1. Os resultados mostraram que concentrações $\geq 5\%$ de lidocaína são capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular. Concentrações a partir de 1% alteraram significativamente a fisiologia celular. O estudo de microanálise de raios X electron-probe demonstrou que esses efeitos estão associados a apoptose. Os testes de atividade celular MTT e WST-1 tenderam a diminuir em resposta ao aumento crescente dos tempos de incubação para a maioria das concentrações de

lidocaína, e para as concentrações crescentes de lidocaína. É importante remarcar que neste estudo não foram avaliados os efeitos celulares dos outros componentes da solução anestésica local de lidocaína, excluindo-lhes dos efeitos citotóxicos encontrados.

Os anestésicos locais comumente utilizados podem produzir neurotoxicidade de uma forma dependente da concentração (Snock, 2012).

Hillerup *et al.* (2011a) mostraram que a injúria neurotóxica induzida pela articaína é ocasionada pela alta concentração do sal anestésico (4%), sendo que a 2% esta injúria é muito pequena. Além disso, observaram que a penetração da agulha e injeção de solução de NaCl na estrutura nervosa não teve efeito significativo na condução nervosa e na histomorfologia nervosa. Em outro estudo, Hillerup *et al.* (2011b) recomendam aos clínicos evitar formulações com alta concentração de anestésicos locais para anestesia do tipo bloqueio.

Numa tentativa de explicar os danos neurotóxicos produzidos pelos anestésicos locais, tem sido proposta como causa a isquemia neural (devido à vasoconstrição local provocada pelo próprio anestésico local ou pela epinefrina) ou a inflamação (Gerner & Strichartz, 2008).

Embora o estudo recente de Baroni *et al.* (2013) demonstrou que a inflamação e a toxicidade produzidas pela lidocaína foram menores quando comparadas com a articaína, não foi observada uma diferença significativa entre os grupos; sugerindo que a articaína 4% não é neurotóxica.

Os perfis clínicos de neurotoxicidade da articaína têm sido baseados na incidência de síndrome neurológica transitória após anestesia espinal e parestesia em odontologia (Pogrel, 2007; Zaric *et al.*, 2005).

2.6.2 Modulação do processo inflamatório

O processo inflamatório se caracteriza pelo recrutamento de leucócitos para os tecidos lesionados, além da ativação das células imune e inflamatórias. O processo de lesão tecidual é complexo e exige comunicação intracelular entre os leucócitos infiltrados, endotélio, epitélio residente, macrófagos e musculatura lisa. A ativação do processo inflamatório pode ser iniciada por lesões físicas, infecções ou por uma resposta imune local, requerendo uma cascata de sinalização completamente orquestrada (Herlaar & Brown, 1999).

Os anestésicos locais têm sido reportados como atenuadores da resposta inflamatória (Peck *et al.*, 2004). Os mecanismos pelos quais os anestésicos locais exercem efeitos sobre a resposta inflamatória continuam pouco esclarecidos.

A literatura tem reportado efeito dos anestésicos locais sobre a modulação de PGE₂, um dos principais mediadores químicos do processo inflamatório. As prostaglandinas são potentes lipídios bioativos de vida curta pertencente à família dos eicosanoides (Funk, 2001). As PGE₂ são produzidas por todos os tipos celulares como epitélio, fibroblastos e células inflamatórias. O papel da PGE₂ no sistema imune e na inflamação é diversificado e complexo (Harris *et al.*, 2002), pois regulam múltiplos aspectos na inflamação e também apresentam múltiplas funções em diferentes tipos celulares (Yu & Chadee, 1998).

Na inflamação, PGE₂ possui um potente efeito vasodilatador e está envolvida em todos os processos que levam aos clássicos sinais de inflamação: vermelhidão, inchaço e dor (Harris *et al.*, 2002; Funk, 2001). A literatura apresenta divergências quanto ao efeito dos anestésicos locais sobre PGE₂, sendo que a expressão dessa molécula pode variar de acordo com a espécie estudada, tipo de lesão, anestésico utilizado e o local de aplicação (Carvalho *et al.*, 2010).

Por outro lado, foi demonstrado que os anestésicos locais afetam o metabolismo do ácido araquidônico e inibem a agregação plaquetária, sugerindo um efeito cardioprotetor pelo efeito antitrombótico (Borg & Modig, 1985).

Em cultura de células de tecidos, os anestésicos locais podem interromper numerosas funções celulares como locomoção, endocitose, exocitose, transporte axônico, fusão celular e manutenção da morfologia normal. Esses efeitos têm sido atribuídos a interferências sobre o citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos) (Yagiela *et al.*, 2011).

Várias atividades enzimáticas Ca²⁺ e calmodulina dependentes e vários sistemas de transporte de membrana também são suscetíveis a influências de anestésicos locais (Volpi *et al.*, 1981).

Entretanto, estudos têm observado que os anestésicos locais reduzem a liberação de mediadores inflamatórios dos neutrófilos, reduzem a adesão de

neutrófilos ao endotélio, reduzem a formação de radicais livres de oxigênio e diminuem a formação de edema (Kaba *et al.*, 2007). Há, além disso, uma variedade de outras ações antitrombóticas e neuroprotetoras dos anestésicos locais quando administrados por via intravenosa (Hollman *et al.*, 2005) que são independentes do bloqueio do canal de Na⁺, mas pode ser responsável por muitas das melhorias na dor pós-cirúrgico (Wang *et al.*, 2011; Kaba *et al.*, 2007). Os anestésicos locais podem aliviar alguns tipos de dor neuropática, e parte desse efeito pode estar relacionada à sensibilização das vias de dor antinociceptivas que ocorrem no estado de dor neuropática; a onde as células gliais da coluna vertebral tem mostrado alguma atividade neste processo (Power, 2011).

2.6.3 Indução da apoptose e necrose celular

A lesão celular induzida por estímulos químicos ou stress físico é, até certo ponto, reversível, mas se o estímulo persistir ou for severo o suficiente desde o início, a célula atinge um “ponto em que não há retorno” e sofre lesão celular irreversível e finalmente, morte celular. A diferenciação entre necrose e apoptose celular é definida baseada em critérios morfológicos e bioquímicos. A necrose é caracterizada pelo rápido inchaço e lise celular, podendo apresentar degradação do DNA (Wyllie *et al.*, 1980). Quando o dano celular às membranas é severo, as enzimas lisossômicas entram no citoplasma e digerem a célula e os componentes celulares vazam, resultando em necrose (Kumar *et al.*, 2005).

Apoptose é um importante processo de morte programada das células, que está presente em uma grande variedade de células de diferentes sistemas biológicos, incluindo o sistema imune, o desenvolvimento embrionário e a renovação das células do organismo (Arends & Wyllie, 1991).

Enquanto a necrose é sempre um processo patológico, a apoptose ocorre em várias funções normais e não esta necessariamente associada à lesão celular. A apoptose pode acontecer por estímulos nocivos (apoptose patológica) como na lesão do DNA pela radiação e drogas citotóxicas anticancerígenas, quando os mecanismos de reparo não puderem lidar com a lesão, a célula ativa a via da apoptose. Esses estímulos (como o calor e a

hipóxia) prejudicam e podem induzir a apoptose se a lesão for moderada, mas doses maiores dos mesmos estímulos resultam em necrose (Cohen, 1997).

Apoptose é caracterizada pela condensação e fragmentação da cromatina nuclear, compactação das organelas citoplasmáticas, dilatação do retículo endoplasmático, diminuição no volume da célula e alterações na membrana plasmática, resultando no reconhecimento e fagocitose das células apoptóticas (Cohen, 1997; Arends & Wyllie, 1991).

O processo de apoptose celular é amplamente controlado por uma família de proteases de cisteína aspartato-específicas, denominada de caspases. As caspases correspondem a uma classe de aproximadamente 12 proteases, que são sintetizadas como pro-enzimas inativas, sendo ativadas por clivagem em locais específicos, agindo como iniciadores e executores do processo apoptótico (Werdehausen *et al.*, 2007).

Até o momento, existem dois mecanismos bem caracterizados para ativação da cascata de caspases: a via extrínseca, a qual é iniciada pelo receptor de morte de superfície celular e a via intrínseca caracterizada por mudanças na integridade da mitocôndria (Budihardjo *et al.*, 1999).

Vários estudos conduzidos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a indução da apoptose pelos anestésicos locais sobre condrócitos, células neuronais humanas, células neuronais do gânglio da raiz dorsal de ratos e pré-adipócitos (Jacobs *et al.*, 2011; Keck *et al.*, 2010; Perez-Castro *et al.*, 2009; Gold *et al.*, 1998).

Os anestésicos locais são aminas ligeiramente ácidas em sua forma protonada, apresentando uma constante de dissociação ácida de aproximadamente 8, sugerindo a hipótese que os anestésicos locais agem como desacopladores mitocondriais, colapsando o gradiente de prótons (Sun & Garlid, 1992; Johnson *et al.*, 2002).

A miotoxicidade causada pelos anestésicos locais pode se explicar pela alteração bioenergética mitocondrial. No modelo animal, este efeito tóxico foi significativamente mais severo em ratos jovens (Nouette-Gaulain *et al.*, 2009).

2.7 Ciclodextrinas e complexos de inclusão com anestésicos locais

As ciclodextrinas foram descobertas por Villiers em 1891 e, desde então, têm sido considerados moléculas receptoras promissoras, constituindo complexos de inclusão para uma grande variedade de substâncias (Venturini *et al.*, 2008).

Esses carreadores são produtos cíclicos da hidrólise enzimática do amido por alguns micro-organismos (Loftsson & Masson, 2001). As três ciclodextrinas naturais são alfa (α -CD), beta (β -CD) e gama (γ -CD), compostas de seis, sete e oito unidades de D-(+)-glicopiranoose, respectivamente, unidas por ligações α -1,4 (Udelmann *et al.*, 2007).

As CD são capazes de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas, cujo objetivo é melhorar a hidrosolubilidade dos compostos mais hidrofóbicos (Venturini *et al.* 2008; Loftson & Duchene, 2007; de Paula *et al.*, 2010).

Na sua estrutura, os grupos hidroxila são voltados para o exterior do anel, formado por moléculas de glicose. Isso confere a molécula um exterior hidrofílico e uma cavidade interior hidrofóbica. Tal cavidade relativamente hidrofóbica formada pela forma de anel da molécula permite a encapsulação não covalente de drogas que apresentem dimensões compatíveis, alterando suas propriedades físico-químicas, como solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade (Matioli, 2000; McCormack & Gregoriadis, 1998).

De todas as ciclodextrinas, os diferentes subtipos de β -CD são os mais utilizados (Fernandes *et al.*, 2007; Loftsson & Masson, 2001). Assim, novas formas mais compatíveis, menos tóxicas ao ser humano e com melhores propriedades de carreamento de substâncias, foram desenvolvidas resultando nas formas 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; 2,6-dimetil- β -ciclodextrina e o sulfobutiléter de β -ciclodextrina. Esses derivados hidroxialquilados têm melhores propriedades orgânicas e são poderosos solubilizadores de fármacos, sendo utilizados para complexação de agentes antitumorais (doxorubicina), antidiabéticos (tolbutamida) e anti-inflamatórios (piroxicam) (Araújo *et al.*, 2003).

A HP- β -CD é uma β -CD modificada (sintética), possui uma solubilidade aquosa muito maior (acima de 60%) a diferencia da β CD original que possui uma solubilidade em água relativamente baixa (1.8%). A HP- β -CD possui um

perfil de segurança comprovado, especialmente para uso parenteral (Roquete-Pharma, 2009).

De todos os derivados de CD disponíveis, a HP- β -CD é a mais segura, uma vez que não permeia as membranas. A toxicidade da HP- β -CD tem sido estudada mostrando que possui um potencial hemolítico reduzido, tornando-a adequada para uso parenteral, bem como para aplicações orais e/ou tópicas (Roquete-Pharma, 2009).

Foi demonstrada a biocompatibilidade da HP- β -CD em um estudo realizado em voluntários humanos, que receberam doses de até 470 mg/kg/dia (30 g em 4 dias), e a infusão intravenosa de doses únicas de até 3 g (Irie & Uekama, 1997).

Uma publicação de Gould & Scott, (2005) concluiu que a HP- β -CD é bem tolerada na maioria de espécies, particularmente se é administrada por via oral, e mostra toxicidade limitada, dependendo da dose e via de administração.

As formas farmacêuticas injetáveis usando HP- β -CD como excipiente solubilizante é uma estratégia de formulação segura, que tem a vantagem adicional reduzir a irritação no local da injeção. Pode reduzir o uso de substâncias potencialmente perigosas, tais como surfactantes e co-solventes. Loftsson *et al.* (2005) mostraram que a HP- β -CD pode substituir surfactantes e co-solventes em algumas formulações. Além disso, a complexação de medicamentos com HP- β -CD permite preparar formulações a pH fisiológico. Por exemplo, uma formulação parenteral aquosa de fenitoína contendo HP- β -CD exibiu uma reduzida irritação do tecido e reduzida tendência a precipitar por que os níveis de pH foram perto do fisiológico (Challa, 2005). Isto abre novas perspectivas para as formas injetáveis de algumas drogas e vias de administração alternativas.

A formulação com HP- β -CD é segura e aumenta a biodisponibilidade dos fármacos em formas farmacêuticas dérmicas. Não produz alterações físicas nem químicas na pele. Melhora a liberação da droga a partir de uma camada de difusão aquosa, aumentando a solubilidade da droga (Loftsson & Masson, 2001).

Apesar da existência das ciclodextrinas e suas aplicações na indústria farmacêutica já estarem bem documentadas há décadas, só recentemente passou-se a explorar suas propriedades na liberação controlada de fármacos.

Atualmente muitos fármacos associados à ciclodextrinas já foram aprovados e estão disponíveis no mercado (Davis & Brewster, 2004).

Essas inovações tecnológicas na área de sistemas de liberação controlada de drogas têm atraído pesquisadores devido a muitas vantagens biomédicas associadas a sua aplicação. Abordagens na formulação de liberação controlada de anestésicos locais incluem o encapsulamento a lipossomas, complexação em ciclodextrinas, associação com biopolímeros e outros sistemas de transporte (de Paula *et al.*, 2010).

Assim, estas formulações visam reduzir a concentração do anestésico local utilizado, aumentar a sua permeabilidade e absorção, manter o anestésico local no lugar desejado por períodos mais longos prolongando o efeito analgésico ou anestésico e, por fim, diminuir o clearance e a toxicidade local e sistêmica (de Paula, *et al.*, 2010).

Focalizando o estudo dos anestésicos locais complexados em ciclodextrinas, as características desejáveis para uma molécula anestésica incluem, além de longa duração de ação e da seletividade para o bloqueio sensorial, a diminuição da toxicidade local e/ou sistêmica, uma alternativa que, atualmente, tem se mostrado capaz de promover estes efeitos desejáveis é a liberação modificada desses fármacos, através de formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas (Araujo *et al.*, 2005, 2003).

Assim, a complexação de anestésicos locais em ciclodextrinas tem promovido mudanças na solubilidade aquosa, estabilização físico-química e melhoramento das propriedades farmacodinâmicas (Dollo *et al.*, 1996). Por exemplo, a associação de etidocaína, lidocaína, prilocaína, mepivacaína e bupivacaína com HP- β -CD têm demonstrado melhoras no índice terapêutico e eficácia farmacológica (de Araújo *et al.*, 2006, 2005; Estebe *et al.*, 2002; Dollo *et al.*, 2000, 1998, 1996; Fréville *et al.*, 1996).

Na pesquisa de Moraes *et al.* (2007c) empregando lidocaína e bupivacaína mostraram que a complexação desses anestésicos locais com a HP- β -CD, causa mudanças nas propriedades destes fármacos, como aumento de solubilidade e modificação no perfil de liberação. Tais mudanças são importantes na aplicabilidade destes compostos, podendo causar melhoras na biodistribuição dos mesmos.

Já a bupivacaína em HD- β -CD promoveu um aumento da duração da anestesia em modelos animais quando aplicado o bloqueio epidural, espinhal e do nervo ciático (Fréville *et al.*, 1996; Dollo *et al.*, 2000; Estebe *et al.*, 2002).

A complexação de ropivacaína em HD- β -CD produz um aumento do bloqueio do nervo ciático em ratos. O complexo promoveu um aumento da eficiência farmacológica do anestésico local, permitindo um aumento da disponibilidade de ropivacaína no local de ação e uma anestesia de longa duração com menores efeitos tóxicos (de Araújo, 2008).

O complexo de inclusão de lidocaína/HD- β -CD produziu anestesia com sucesso em 28 de 30 pacientes quando administrada em gotas para olhos (Ranjbar *et al.*, 2012), sendo uma alternativa para a anestesia subconjuntival.

Cereda *et al.* (2012) avaliaram a viabilidade de células de Schwann expostas por 24 horas a bupivacaína 0.5% ou ropivacaína 0.5% complexadas ou não com HP- β -CD e revelaram que não existe diferença significativa na citotoxicidade entre as formulações livres ou complexadas.

Na atualidade, o desenho de novos sistemas de liberação controlada de drogas para os anestésicos locais devem se concentrar em como atingir maiores concentrações de anestésico dentro de um carreador celular, e como manter a sua liberação (de Paula *et al.*, 2012). Embora as pesquisas reportadas na literatura envolvendo a complexação de moléculas de anestésicos locais com HP- β -CD sejam variadas e com resultados promissórios sobre novas formulações de anestésicos locais; nenhuma delas tem empregado articaína.

3. PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito *in vitro* da articaína associada a diferentes concentrações de epinefrina ou à HP- β -CD sobre a viabilidade celular em culturas de queratinócitos humanos (HaCaT).

Avaliar o efeito *in vitro* dos adjuvantes metabissulfito de sódio, epinefrina e HP- β -CD sobre a viabilidade celular em culturas de queratinócitos humanos (HaCaT).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Células HaCaT, formulações anestésicas e reagentes

As células HaCaT foram gentilmente doadas pela Dra. Liudmila Kodach (Amsterdam Medical Center), Amsterdam (Holanda) ao Instituto de Biologia da UNICAMP.

Foram utilizadas diferentes soluções de articaína - ATC (DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, Brasil) em concentrações variando entre 0.1% a 4%, associadas ou não com epinefrina (Sigma-Aldrich Chem. Corp. St. Louis, MO, USA) em concentrações de 1:200.000, 1:100.000 e 1:50.000. O teste Vybrant[®] MTT foi obtido de Molecular Probes *Life Technologies* (USA). O FBS e o meio DMEM foram obtidos da Vitrocell Embriolife Lab. (Campinas, Brazil). A tripsina 0.25% com EDTA (1X) foi obtida do GIBCO *Life Technologies* (USA). Também foram preparados complexos de articaína com HP- β -CD (Kleptose HP[®]), a qual foi obtida do Roquette Serv. Tech. Lab. (Lestrem, França), no Laboratório de Biomembranas do IB-UNICAMP, sob a orientação da Profa. Dra. Eneida de Paula.

Os complexos de inclusão foram produzidos misturando quantidades equimolares de HP- β -CD e ATC (razão molar 1:1), em água deionizada, à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) durante 24 h. Após atingir o equilíbrio, com a dissolução completa, a solução foi colocada em tubos falcon de 15 mL, congelada e armazenada a -20 °C (Metalfrío, Brazil) (Araújo *et al.*, 2008). Posteriormente, os tubos contendo a solução congelada foram levados para o processo de liofilização por 72 h (Lyo Chamber Guard Christ LCG, Alfa 2-4 LD Plus; Nova Analitica, Germany). Após este processo, foram pesadas diferentes quantidades do complexo liofilizado e diluídas em meio DMEM sem FBS até atingir concentrações determinadas nas condições experimentais do presente estudo. Antes de serem utilizadas, todas as soluções foram filtradas usando filtros TPP para seringa com membrana polietersulfônica (PES) com tamanho de poro de 0.22 μ m, para filtrações de soluções aquosas (área de filtração de 4 cm²; dimensões de 27 mm x 33 mm).

4.2 Avaliação da formação do complexo de inclusão ATC/ HP- β -CD por microscopia eletrônica de varredura

A análise morfológica das amostras de ATC, HP- β -CD, misturas físicas de ATC/HP- β -CD e complexos de inclusão ATC/HP- β -CD (1:1) foram analisadas no MEV Jeol JSM – 5600LV (Japão). As amostras foram montadas em *stubs* de alumínio, usando fita dupla face e cobertas com ouro sob vácuo por 120 segundos, para tornarem-se eletricamente condutivas, segundo a técnica adaptada de Araujo *et al.*, (2008).

4.3 Cultura celular

Para o ensaio foram utilizadas células HaCaT (Human adult low Calcium high Temperature) imortalizadas. Essa linhagem celular de queratinócitos foi criada pelo Centro de Pesquisa do Câncer em Heidelberg, Alemanha (Boukamp *et al.*,1988), as quais cresceram na periferia de um melanoma maligno primário, porem mantendo as características das células normais.

As células foram mantidas em uma cultura em monocamada em 5% de CO₂, a 37 °C, em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Vitrocell Embriolife) suplementado com 10 % soro fetal bovino (FBS; Vitrocell Embriolife) e 1% de penicilina/estreptomicina (penicilina 10.000 UI/mL, estreptomicina 10 mg/mL; Cultilab).

A cultura foi duplicada duas vezes por semana por tratamento com tripsina 0.25% com EDTA (1X) (GIBCO) para a liberação das células. Utilizando uma câmara de Neubauer, foi realizada a contagem celular e aproximadamente 5x10⁴ células/200 μ L foram adicionadas a cada um dos poços das placas de cultura de tecidos com 96 poços e incubadas por 24 h. A confluência das monocamadas de 80% foi verificada com microscópio invertido (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Alemanha).

4.4 Condições experimentais

As células foram expostas aos seguintes tratamentos, sendo todas as formulações com pH próximo ao fisiológico e com concentração final no meio de cultura conforme indicado:

1. ATC a 4%, 2%, 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2% ou 0.1%;
2. Epinefrina a 1:50.000, 1:100.000 ou 1:200.000;
3. ATC a 4%, 2%, 1% ou 0.5% associada à epinefrina 1:50.000, 1:100.000 ou 1:200.000;
4. HP- β -CD a 4%, 2% ou 1%;
5. Formulação de HP- β -CD/ATC contendo ATC a 4%, 2%, 1%, 0.5%;
6. Metabissulfito de sódio 0.5 mg/mL;
7. Apenas meio de cultura (pH = 8) – grupo controle.

Após a adição dos tratamentos, as placas (n = 9) três por três, foram incubadas a 37 °C por 10, 30, 60 e 240 minutos. Terminadas as incubações, a viabilidade celular foi estimada pelo método da redução do MTT.

4.5 Avaliação da viabilidade celular – MTT

O ensaio MTT baseia-se na conversão de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em cristais de formazana por células vivas, o que determina a atividade mitocondrial (Mosman, 1983). Uma vez que para a maioria das populações de células a atividade mitocondrial total é relacionada com o número de células viáveis, este ensaio é largamente utilizado para medir a efeitos citotóxicos *in vitro* de fármacos sobre linhagens de células primárias ou de células doentes.

Após a incubação das placas com as formulações nos tempos descritos, os poços foram esgotados, lavados duas vezes com PBS (GIBCO), pH=7.4, sendo então colocados 200 μ L da solução de MTT a 0.3 mg/mL em meio DMEM. As placas foram incubadas por três horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente os poços foram lavados duas vezes com PBS, pH=7.4, e preenchidos com 200 μ L de etanol PA. Finalmente, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de ELISA a 570 nm.

4.6 Análise da citotoxicidade por microscopia de fluorescência

Os resultados do MTT foram confirmados por microscopia de fluorescência. As células HaCaT foram cultivadas como descritas anteriormente e transferidas para as placas de cultura de células de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas e em seguida foram aplicados os

tratamentos. Terminados os períodos de incubação a citotoxicidade das formulações foi verificada através da marcação pelos reagentes de viabilidade/citotoxicidade para células mamíferas Live/Dead[®] (Invitrogen *Life Technologies*).

As células vivas convertem a calceína permeável não fluorescente em calceína impermeável fluorescente verde, ao qual se distribui uniformemente pelo citoplasma da célula, por meio da atividade de esterases. As células mortas ou com a membrana danificada são marcadas com o homodímero-1 de Etídio pela ligação a ácidos nucleicos, emitindo uma fluorescência vermelha. Este marcador é excluído pelas membranas das células intactas.

Os reagentes EthD-1 e calceína-AM foram combinadas formando uma solução com concentração final de 2 μ M de calceína-AM e 4 μ M de EthD-1 (Live/Dead[®]). Aproximadamente 300 μ L dessa solução foram adicionados às placas de cultura de células, cobrindo toda a extensão. As células foram incubadas por 30 a 45 minutos na temperatura ambiente, protegidas da luz.

As imagens foram feitas no microscópio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL acoplado a câmera AxioCam MEC (Carl Zeiss, Alemanha). A calceína foi visualizada utilizando filtro na faixa de comprimento de onda 450-490 nm (Ex)/ 515-565 (Em). Já as células marcadas em vermelho foram visualizadas na faixa de comprimento de onda de 528-546 nm (Ex)/ 590-617nm (Em).

4.7 Forma de análise dos resultados

Para se testar a hipótese nula de que qualquer diferença encontrada nos tratamentos seria meramente ao acaso, esses dados foram primeiramente testados quanto à normalidade de distribuição (teste de Shapiro-Wilks) e equivalência das variâncias (teste de Levene). Os dados de viabilidade celular apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias sendo aplicados two-way ANOVA e Tukey como análise post-hoc. Todas as análises foram realizadas pelo pacote estatístico GraphPad[®] 6.0, com nível de significância de 5% ($\alpha=0.05$).

5. RESULTADOS

5.1 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 1 mostra a estrutura das formulações por MEV.

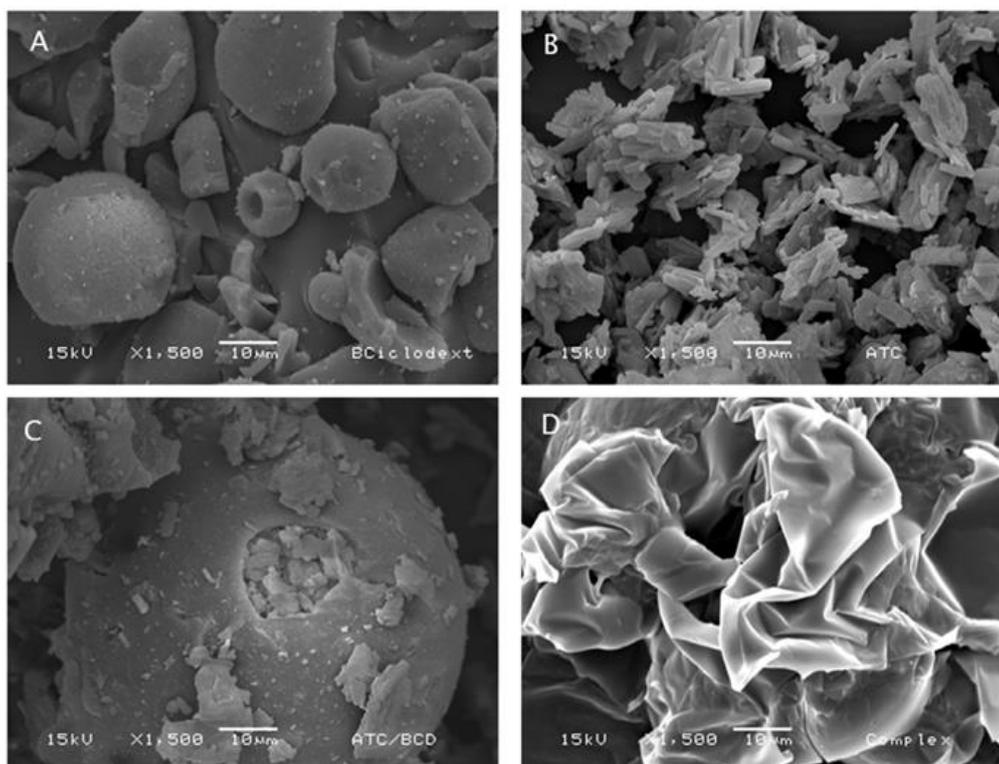


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura das formulações de HP- β -CD (A), ATC (B), mistura física de ATC e HP- β -CD na razão molar 1:1 (C) e complexo de inclusão ATC e HP- β -CD de razão molar 1:1 (D). Magnificação 1500x, escala bar = 10 μ m.

A Figura 1 resalta as características de aspecto e tamanho das substâncias puras (ATC e HP- β -CD) e do complexo. Os cristais de HP- β -CD apresentam formas semiesféricas variando em tamanho, com superfície lisa e contornos definidos (Figura 1A). Os cristais de ATC mostraram agrupados, de formas prismáticas e de contornos retos (Figura 1B). A mistura física de ATC e HP- β -CD (Figura 1C) mostrou os cristais de ATC preenchendo o interior dos cristais da HP- β -CD. Já o complexo (Figura 1D) mostrou uma estrutura completamente diferente, com um aspecto laminar amorfo de tamanho variável, mas muito maior do que as formas isoladas ou da mistura física.

5.2 Viabilidade celular

A Figura 2 mostra a influência dos adjuvantes metabissulfito de sódio (MBS), HP- β -CD (BCD) e epinefrina (epi) sobre a viabilidade celular.

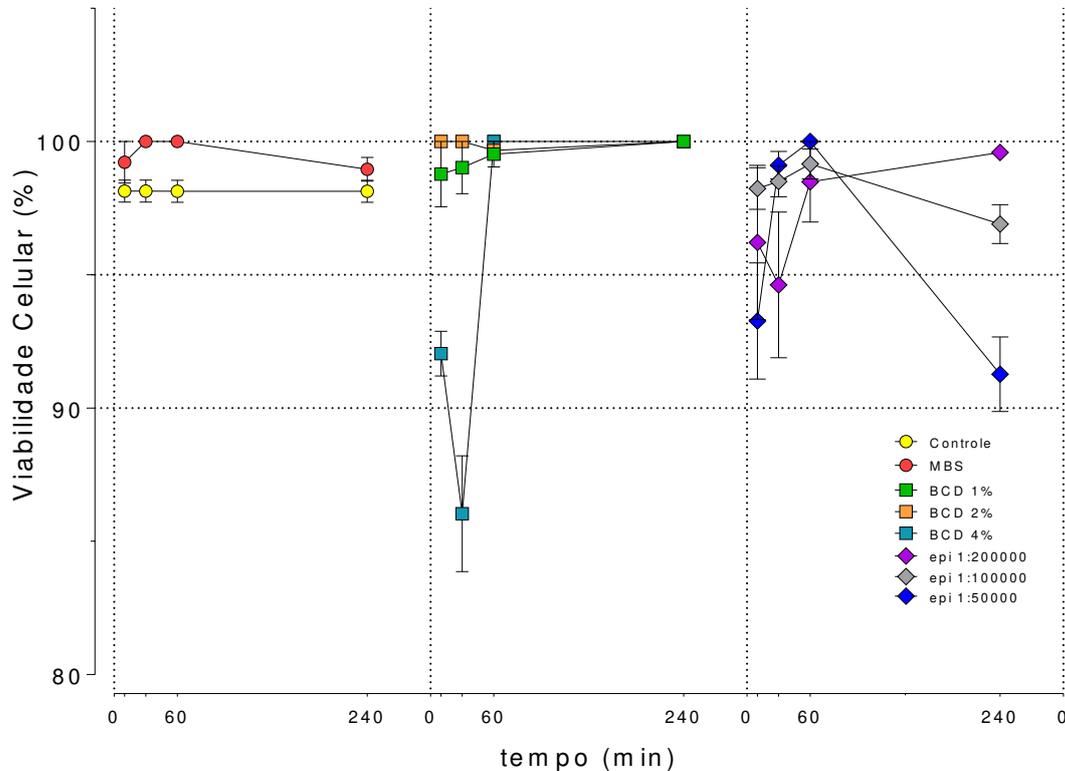


Figura 2. Influência dos adjuvantes sobre a viabilidade celular (média \pm DP), $p < 0.05$. MBS = metabissulfito de sódio; BCD = HP- β -CD; epi = epinefrina.

Não houve diferenças estatisticamente significantes (two-way ANOVA, $p > 0.05$) na viabilidade celular entre os grupos MBS 0.5mg/mL, epinefrina 1:200.000, epinefrina 1:100.000, BCD1% e BCD2% em relação ao grupo controle em nenhum dos tempos avaliados. Houve, entretanto, uma diminuição significativa na viabilidade entre o grupo BCD 4% e o controle nos tempos de 10 e 30 minutos. No entanto, essa diferença não foi significativa nos tempos de 60 e 240 minutos. A epinefrina 1:50.000 causou diminuição significativa na viabilidade celular em relação ao controle apenas após 4 horas de exposição ($p < 0.05$). Assim, de uma maneira geral, o carreador, o metabissulfito de sódio e a epinefrina mostraram biocompatibilidade, mas é possível que nas maiores concentrações a epinefrina e a HP- β -CD possam interferir na viabilidade celular.

A Figura 3 mostra o efeito da articaína sobre a viabilidade celular ao longo do tempo e em função das concentrações estudadas.

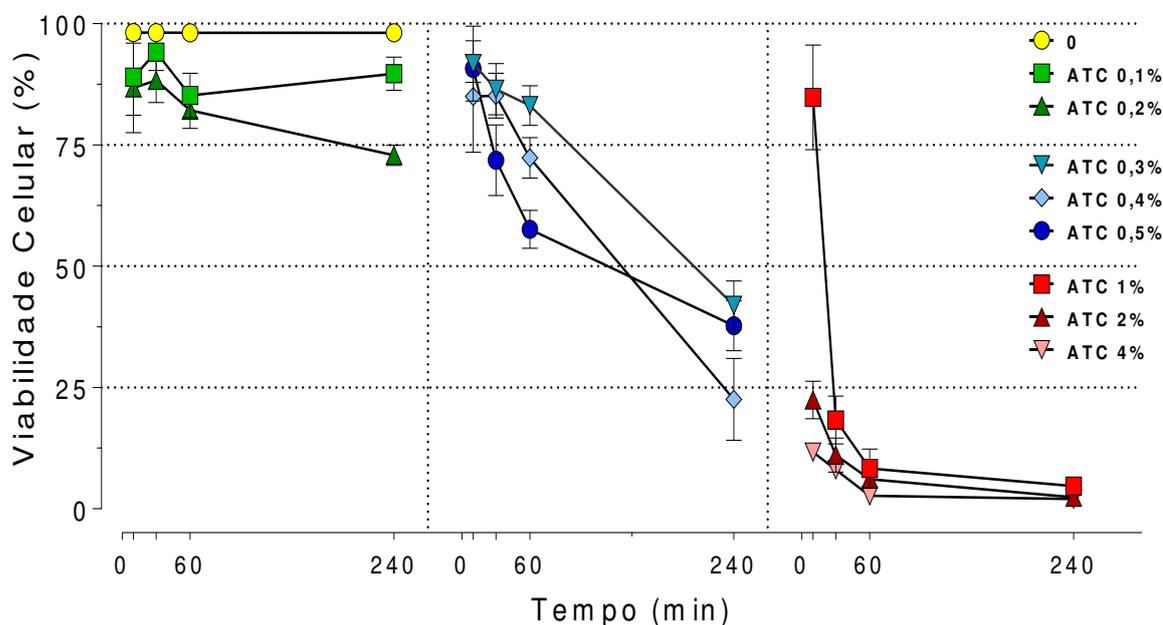


Figura 3. Efeito da articaína ao longo do tempo sobre a viabilidade celular. (Média \pm DP), $p < 0.05$.

Embora a viabilidade celular tenha sido significativamente menor com ATC 0.1% no tempo de 60 minutos ($p < 0.05$) em relação ao controle, não houve diferenças significantes nos demais tempos com o tratamento de ATC 0.1%. De uma forma geral, a partir de 10 minutos de exposição, a ATC em concentrações entre 0.2% até 4% mostrou redução significativa na viabilidade das células HaCaT quando comparada com o controle ($p < 0.05$). Isso mostra que a toxicidade da ATC é dependente do tempo de exposição e principalmente da concentração do fármaco. Em concentrações de ATC maiores que 0.2%, a viabilidade celular é reduzida a menos de 50% após 4h de tratamento. Concentrações maiores que 0.5% causaram redução de aproximadamente 75% das células, já a partir de 30 minutos.

A Figura 4 mostra o efeito da adição de três concentrações (1:50.000, 1:100.000 e 1:200.000) de epinefrina a quatro concentrações (0.5%, 1%, 2% e 4%) de articaína sobre a viabilidade celular de células HaCaT.

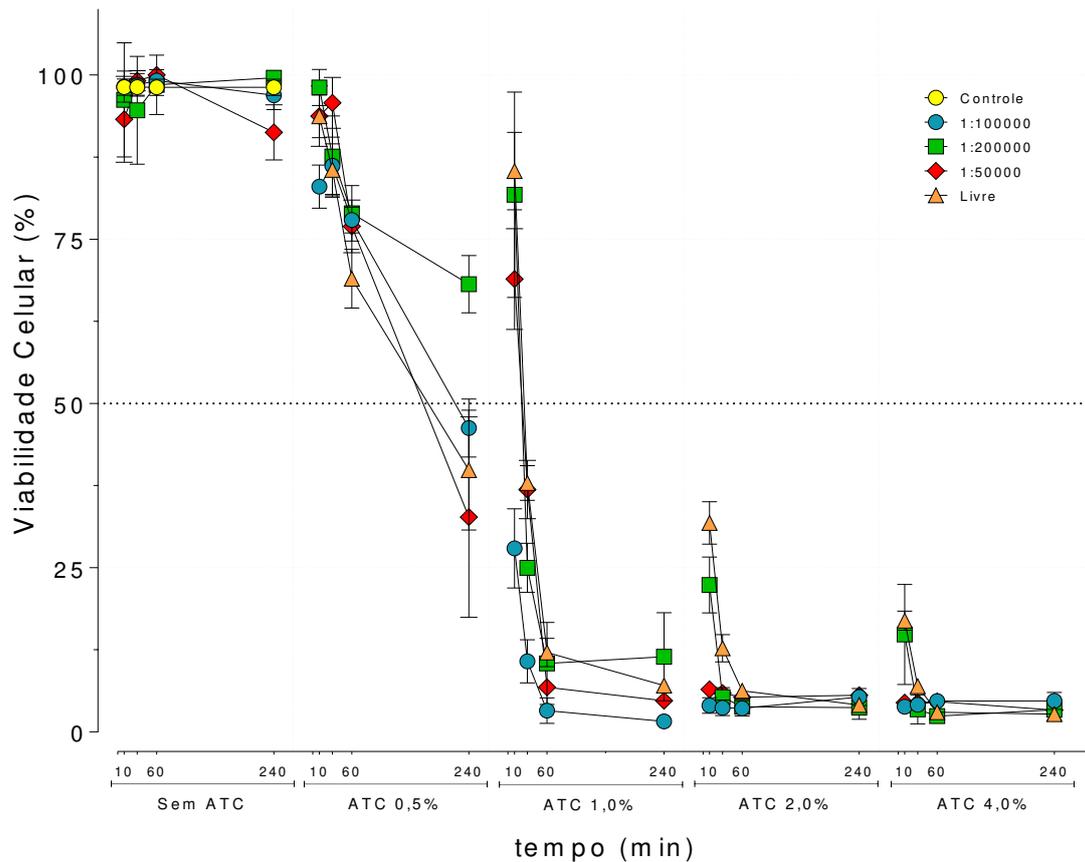


Figura 4. Efeito da associação de epinefrina (epi) à articaína (ATC) ao longo do tempo sobre a viabilidade celular. (Média \pm DP), $p < 0,05$.

A epinefrina sozinha não alterou a viabilidade celular em relação controle em nenhuma das concentrações estudadas, exceto no período de 4 horas, quando a epinefrina 1:50.000 diminuiu a viabilidade em relação ao controle e ao grupo com epinefrina 1:200.000 ($p < 0,05$). Além disso, ocorreu diminuição da viabilidade para a epinefrina 1:50.000 no período de 4 horas em relação aos demais períodos deste grupo.

Independentemente do período considerado, houve diminuição significativa da viabilidade celular para as concentrações maiores que 0,5% de ATC quando comparadas aos respectivos controles. Além disso, nas concentrações iguais ou superiores a 0,5% de ATC houve tendência de menor toxicidade celular para as formulações com ATC livre ou com epinefrina

1:200.000 quando comparadas com as demais formulações. Entretanto, esse efeito também foi influenciado pelo tempo de exposição, pois quanto maior era o tempo de exposição, menor era a viabilidade independentemente da concentração de ATC (entre 0.5 e 4.0%).

Para a ATC 0.5%, foi possível observar que a combinação com a epinefrina 1:200.000 induziu maior viabilidade do que a ATC livre ou combinada com as outras concentrações de epinefrina. Assim, para essa concentração de ATC, a epinefrina 1:200.000 diminuiu a toxicidade da ATC nas células HaCaT. De forma inversa, houve tendência de maior toxicidade da ATC quando essa era associada à epinefrina 1:100.000 e 1:50.000.

A Figura 5 mostra o efeito da associação da HP- β -CD à ATC sobre a viabilidade celular dos queratinócitos em comparação ao controle e às formulações dos adjuvantes.

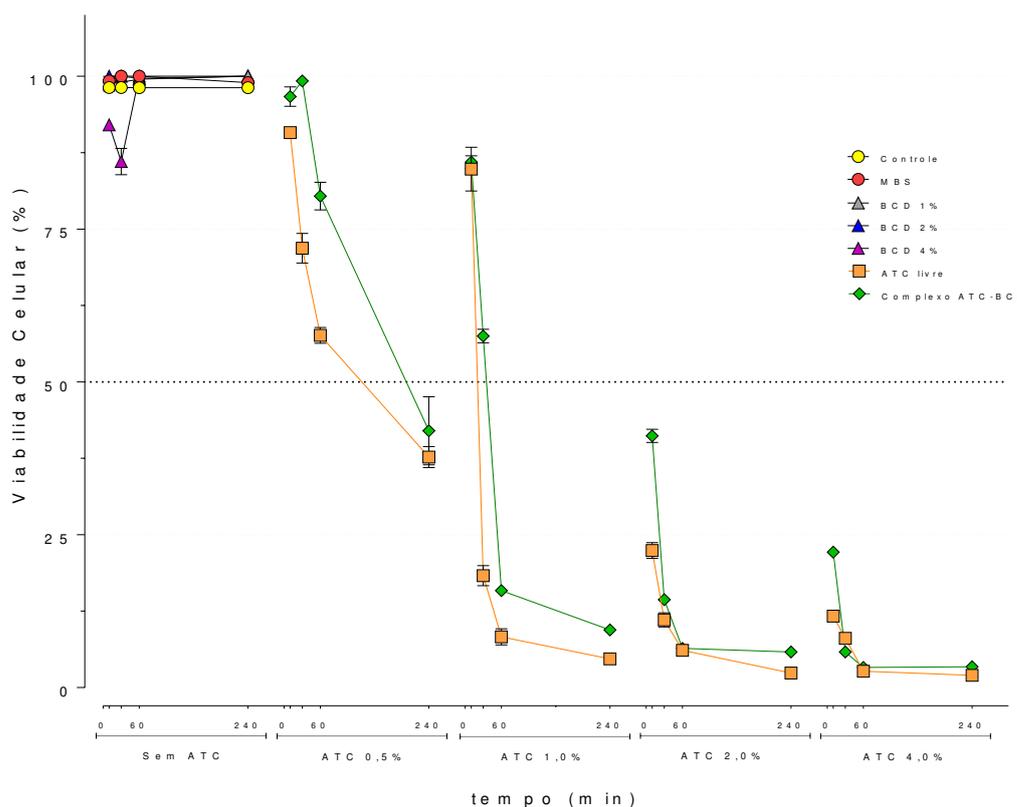


Figura 5. Efeito da associação de HP- β -CD à articaína (ATC) ao longo do tempo sobre a viabilidade celular. (Média \pm DP), $p < 0.05$.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o controle e o complexo de ATC 0.5% e BCD na viabilidade celular nos tempos de 10 e 30 minutos. Já a ATC 0.5% promoveu redução da viabilidade celular em todos os períodos em relação ao controle. A viabilidade foi significativamente maior no complexo quando comparada à ATC 0.5%, exceto no período de 4 horas.

Quando comparadas com os grupos tratados com ATC 1% livre, a viabilidade celular foi significativamente maior nos grupos tratados com o complexo a 1% nos tempos de 30 e 60 minutos. Para os grupos com concentração de ATC 2% e 4%, o complexo promoveu maior viabilidade, mas apenas no período de 10 minutos.

5.3 Avaliações da viabilidade/citotoxicidade celular Live/Dead®

Nos grupos controle, foram identificadas algumas características morfológicas normais dos queratinócitos como o tamanho e a forma poliédrica, dispostas em contato íntimo entre elas. Como a atividade enzimática das esterases citoplasmáticas, oriundas das células vivas, sobre a calceína produz uma cor verde intensa, as células marcadas com essa cor apresentavam viabilidade. Essa cor foi intensamente observada nas células dos grupos controle e células expostas a concentrações baixas de ATC (0.1%) e do complexo contendo 0.1% de ATC.

Alterações da forma celular, a qual passou de poliédrica a arredondada, foram observadas nas células HaCaT expostas a ATC 1% por 10 minutos e ao complexo de ATC 0.5% em 1 hora. Além disso, a cor vermelha brilhante, produto da ligação do EthD-1 com os ácidos nucleicos e a perda de contato celular, a qual é indicadora de morte celular foram observadas nas células expostas a ATC 1% livre e ao complexo ATC/HP- β -CD 1% por 1 hora. Esses resultados estão expostos nas Figuras 6 e 7.

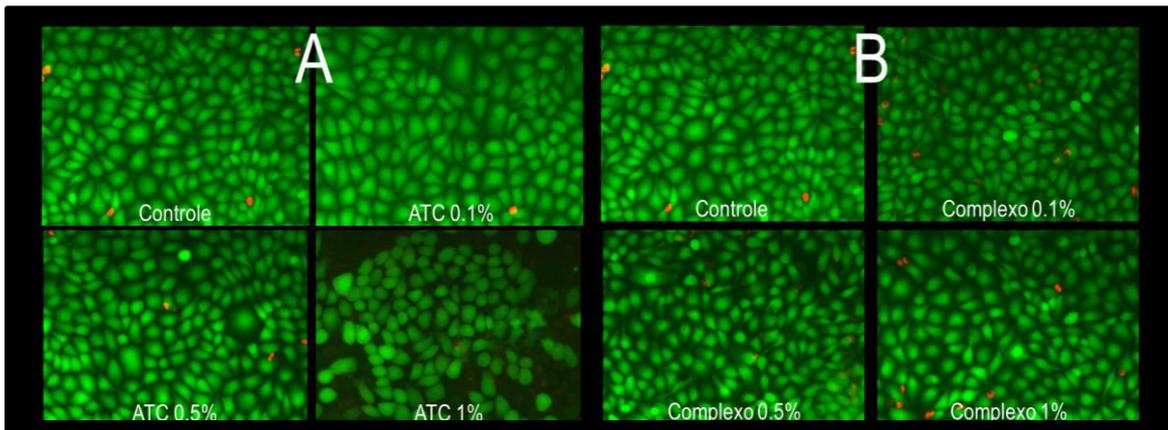


Figura 6. Efeito da articaína (A) e o do complexo (B) sobre a viabilidade celular após 10 minutos. Aumento de 20 vezes. Coloração Live/Dead®.

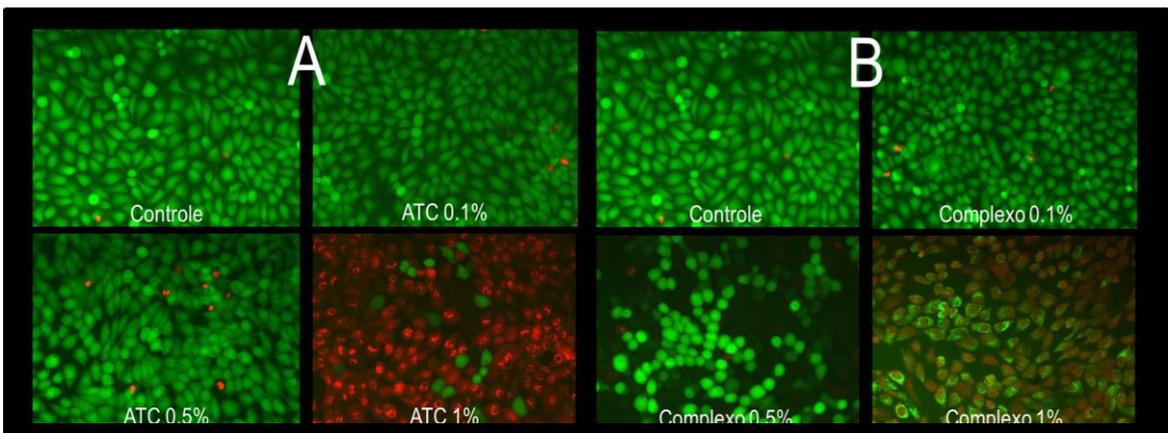


Figura 7. Efeito articaína (A) e do complexo (B) sobre a viabilidade celular após 1 hora. Aumento de 20 vezes. Coloração Live/Dead®.

6. DISCUSSÃO

A articaína tem sido amplamente utilizada com sucesso em diferentes procedimentos odontológicos de rotina (Pellicer-Chover *et al.*, 2013; Kambalimath *et al.*, 2013; Tortamano *et al.*, 2013). Entretanto, existem poucas pesquisas sobre os seus efeitos citotóxicos ou sobre os efeitos da sua associação com epinefrina ou carreadores, como a HP- β -CD. Porém, existem estudos dos efeitos citotóxicos de outros anestésicos locais (Jafarnia *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2011; Pescosolido *et al.*, 2011).

Neste estudo, foi utilizada uma cultura de queratinócitos humanos imortalizada (HaCaT), a qual é um modelo experimental bem definido para explorar a resposta celular sobre diferentes contextos, justificando seu amplo emprego em estudos *in vitro* para investigação de vias de sinalização intracelulares e respostas a alguns tipos de estresse (Boukamp *et al.*, 1988; Ravid *et al.*, 2002). Essa linhagem celular é não-tumorogênica e é caracterizada por uma capacidade de diferenciação altamente conservada e uma elevada estabilidade genética (Boukamp *et al.*, 1988). Apresentam ainda um crescimento aderente, são dispostas em camadas planas e são quase completamente preenchidas pelo núcleo, formando uma arquitetura epidérmica quase normal (Jaegera *et al.*, 2012). Assim, a cultura celular utilizada no estudo foi apropriada para observar os efeitos da articaína e seus adjuvantes.

De forma geral, os resultados do presente estudo evidenciam que tanto a concentração como o tempo de exposição à articaína afetam a viabilidade e fisiologia de células HaCaT. Estudos realizados com outros anestésicos locais, como a lidocaína, demonstraram que estes podem induzir apoptose em culturas de células T de linfoma (Jurkat) de uma maneira tempo-dependente, como determinado pelo ensaio de anexina V (Boselli *et al.*, 2003). Recentemente, outra pesquisa mostrou o efeito citotóxico da lidocaína em condrócitos humanos de uma maneira dose e tempo-dependente (Jacobs *et al.*, 2011). O presente trabalho se relaciona diretamente com os achados anteriores confirmando os efeitos citotóxicos da articaína livre em uma ampla gama de concentrações e tempos de exposição.

O ensaio metabólico com MTT evidenciou que a concentração de 0.1% de articaína livre não foi capaz de afetar significativamente a função mitocondrial após 4 h de exposição. De fato, a análise de células incubadas em concentrações de articaína livre 0.1% confirmou que uma elevada porcentagem de células tinha função metabólica adequada e integridade da membrana celular.

Por outro lado, as concentrações de ATC livre maiores ou iguais a 0.2% foram associadas a efeitos citotóxicos significativos. Resultados similares foram obtidos por Werdehausen *et al.*, (2012) os quais mostraram que a CL₅₀ para articaína foi de 5.3 mmol/L (equivalente a 0.17%). Os resultados do presente estudo mostram que concentrações de articaína elevadas estariam associadas a uma alteração da integridade da membrana celular. Embora não existam estudos mostrando a concentração tecidual da articaína após sua injeção, poderia ocorrer danos celulares estruturais em concentrações utilizadas clinicamente (4%).

Foi demonstrado previamente que os anestésicos locais podem produzir mudanças na morfologia celular como vacuolização de fibroblastos da pele humana (Pena *et al.*, 1982). Outro estudo descreveu que a lidocaína, mepivacaína e prilocaína foram capazes de produzir arredondamento celular e desprendimento do substrato de fibroblastos gengivais de ratos, dependendo do tipo de anestésico, da concentração e do tempo de exposição (Johnson *et al.*, 1986). A lidocaína causou, de uma maneira dose e tempo dependente, mudanças conformacionais em eritrócitos como resultado da agregação da espectrina (Nishiguchi *et al.*, 1995). Além disso, um estudo realizado em células de neuroblastoma revelou que diferentes anestésicos locais, incluindo a articaína, induziram apoptose de forma concentração-dependente, sendo que as concentrações maiores foram capazes de produzir morte celular por necrose (Werdehausen *et al.*, 2009). Todos estes trabalhos concordam com os efeitos citotóxicos da articaína livre achados no presente estudo pelos testes de MTT e microscopia de fluorescência.

Embora as recentes investigações sobre a toxicidade de anestésicos locais tenham avaliado o mecanismo de morte celular induzida por esses

medicamentos em tecidos e células orofaciais (Villarruel *et al.*, 2011; Fedder *et al.*, 2010) o mecanismo de morte celular gerado pela articaína ainda não está completamente elucidado.

Outro fator importante na citotoxicidade dos anestésicos locais e particularmente para a articaína é a toxicidade induzida pelos seus metabólitos. O mais conhecido metabólito da articaína é o ácido articaínico, o qual é produzido pela hidrólise proporcionada por colinesterases plasmáticas e teciduais. Este ácido é inativo e é parcialmente metabolizado conjugado com o glucoronato no rim, sendo excretado pela urina nessa forma (25%) e 75% na forma de ácido (Vree & Gielen, 2005).

Foi demonstrado que em tecidos com redução da circulação sanguínea (por torniquete), 55% da dose era rapidamente metabolizada, sendo que 20% era metabolizada pelas esterases plasmáticas e 35% pelas teciduais (Snoeck, 2012). Assim, a habilidade do tecido em metabolizar a articaína poderia ser fundamental para sua toxicidade. Embora não existam estudos mostrando a citotoxicidade do ácido articaínico, a C_{max} e a área sob a curva (ASC) deste são mais de 5 vezes maiores do que os valores observados para a articaína (Snoeck, 2012).

Queratinócitos humanos, como as células HaCaT, são conhecidos por sintetizar e secretar acetilcolina não neuronal, a qual serve como sinalizador celular e regula funções tais como proliferação, adesão, contato desmossomal e atividade glandular da célula. Além disso, estas células também produzem acetilcolinesterase, a qual é encontrada dentro ou próximo da membrana celular, associada a feixes filamentosos intracelulares (Grando, 1997). Produzem também a carboxilesterase de forma abundante (Zhu *et al.*, 2007) dentre outras esterases. Desta forma, estas células poderiam ser capazes de metabolizar a articaína, produzindo ácido articaínico. Ainda não existem estudos provando essa possibilidade, mas seria possível que parte dos efeitos tóxicos verificados no presente estudo poderiam ser ocasionados pelo ácido e não pela articaína na sua forma livre.

Pouca atenção tem sido dada a possível toxicidade da epinefrina comumente associada aos anestésicos locais. A utilização desse tipo de

vasoconstritor demanda a adição de pelo menos um agente antioxidante (usualmente sulfitos), devido à alta taxa de oxidação do vasoconstritor, causada por vários fatores, tais como luz e calor. Além disso, usualmente o pH destas formulações varia entre 3.5 a 5.5.

Dragoo *et al.*, (2010) mostraram que a grande toxicidade causada por anestésicos locais contendo epinefrina em condrócitos poderia ser atribuída à combinação do baixo pH e substâncias como o metabissulfito de sódio. Assim, é possível que o vasoconstritor seja uma importante fonte de toxicidade celular e, por esse motivo, a epinefrina foi testada em três concentrações no presente estudo.

Hashimoto *et al.*, (2001) observaram um aumento da neurotoxicidade induzida pela lidocaína com disfunção sensorial persistente e dano histológico em ratos após a administração concomitante com epinefrina, sendo que a epinefrina não mostrou neurotoxicidade quando administrada sozinha. Os autores argumentam que a vasoconstrição gerada pela epinefrina poderia ser o mecanismo responsável, gerando uma redução do fluxo sanguíneo e limitando a absorção da lidocaína, incrementando mesmo assim o efeito local tóxico do anestésico. No entanto, Werdehausen *et al.*, (2011) demonstraram que a epinefrina em concentração de 7 ou 70 μM não produz um incremento da citotoxicidade da lidocaína medida pela apoptose celular em astrócitos de ratos quando expostos a 24 h de tratamento. Essas diferenças poderiam ser explicadas pelos diferentes modelos experimentais, sendo que o comportamento da epinefrina associada a anestésicos locais poderia ser diferente em tecidos e células.

No presente estudo, a epinefrina a 1:50.000 causou diminuição significativa na viabilidade celular após 4 horas de exposição, confirmando que a citotoxicidade pode ser dose- e tempo-dependente. Já o metabissulfito de sódio a 0.5mg/mL não produziu nenhuma alteração na viabilidade celular, concordando com os achados de Seravalli & Lear, (1987) os quais verificaram que em células de neuroblastoma, concentrações similares de bissulfito não mostraram toxicidade.

Similarmente, em um estudo *in vitro*, Dänicke *et al.*, (2010) avaliaram a viabilidade celular pela determinação da atividade da desidrogenase mitocondrial e demonstraram que o metabissulfito de sódio até uma concentração de 8 μ M (aproximadamente 1.52 mg/mL) não afetou significativamente a viabilidade de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC), nem de linhagens de celulares epiteliais de intestino (IPEC-1 e IPEC-2) de porco, resultados similares aos observados no presente estudo.

No entanto, o metabissulfito de sódio em concentração de 0.5 mg/mL teve um efeito significativo sobre a morte celular em condrócitos humanos após 24 h de tratamento (Dragoo *et al.*, 2010). Esse resultado indica que em concentrações similares, o metabissulfito de sódio pode ser tóxico dependendo do tempo de exposição e da linhagem celular na qual esta sendo avaliada.

As ciclodextrinas têm sido propostas em sistemas de liberação controlada visando diminuir os efeitos tóxicos de formulações anestésicas (de Paula *et al.*, 2012). Esta combinação visa o aprimoramento de efeitos terapêuticos, farmacológicos e redução dos efeitos tóxicos (de Araújo *et al.*, 2008). De todas as ciclodextrinas, a HP- β -CD possui melhor compatibilidade e segurança, especialmente para uso parenteral (Roquete-Pharma, 2009; Irie & Uekama, 1997) e, por isso, foi utilizada no presente estudo.

O ensaio metabólico com MTT evidenciou que a ATC a 0.5% livre foi capaz de afetar significativamente a função mitocondrial após 10 min de exposição. Já a ATC a 1% mostrou uma elevada porcentagem de células com alterações na função metabólica e integridade da membrana celular como determinado pelo método de Live/Dead[®]. No entanto, as células HaCaT não mostraram diminuição significativa da função mitocondrial quando incubadas com o complexo ATC a 0.5% com HP- β -CD, nos tempos de 10 e 30 minutos, o que demonstra a redução da toxicidade da ATC quando complexada com HP- β -CD. A complexação da ATC a 0.5% com HP- β -CD mostrou um efeito citotóxico significativamente menor até 1 h quando comparada com a ATC a 0.5% livre. Estes resultados poderiam ser em parte ocasionados pela diminuição do metabolismo da ATC, o que é uma propriedade já relatada de diversos carreadores, incluindo a HP- β -CD.

Cereda *et al.*, (2012) não encontraram diferenças significativas na viabilidade de células de Schwann após tratamento com ropivacaína ou bupivacaína a 0.5%, ambas complexadas com HP- β -CD, quando comparadas com as respectivas formulações livres. Embora os resultados destes autores indiquem que a complexação com HP- β -CD não melhorou o perfil tóxico daqueles anestésicos, é importante salientar que os autores utilizaram apenas uma concentração dos anestésicos, sendo que as culturas foram avaliadas apenas após 24 h. No entanto, a complexação com a HP- β -CD diminuiu os níveis de creatinina quinase sérica em 5.5 vezes em comparação aos grupos tratados com as formulações livres e diminuíram o nível de miotoxicidade. Assim, é possível que os efeitos da complexação com os carreadores dependam do tipo de anestésico local, da célula em estudo, da concentração e do tempo de exposição, como demonstrado no presente estudo.

Como já mostrado por Hillerup *et al.*, (2011a) em tecido nervoso de ratos, a injúria neurotóxica induzida pela articaína pode ser ocasionada pela alta concentração desse anestésico (4%), sendo que a 2% está injúria é muito pequena (Hillerup *et al.*, 2011b). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a toxicidade da articaína foi dependente não somente da concentração do sal anestésico, mas também do tempo de exposição da célula ao anestésico. As concentrações mais baixas não tiveram um impacto significativo sobre a cultura celular, mesmo em períodos mais prolongados de exposição. No entanto, mesmo em concentrações moderadas (0.3%, 0.4% e 0.5%) a articaína mostrou citotoxicidade considerável em tempos de exposição mais prolongados (entre 60 e 240 min). Obviamente, a extensão da exposição à articaína em tecidos vivos depende de vários fatores, sendo que a maior parte deles não é reproduzida em ensaios em culturas celulares e teciduais.

Provavelmente, o fator mais importante que afeta o tempo de exposição da célula a um anestésico local seja a sua meia-vida de eliminação, dentro de um sistema complexo de metabolização tecidual. Assim, quanto menor a meia-vida de eliminação de uma substância em um tecido, maior será a exposição da célula àquela substância. Um estudo em pacientes submetidos à anestesia epidural com articaína mostrou que a meia-vida de eliminação da articaína é de 0.6 horas na fase de distribuição e 2.5 horas na segunda fase (hidrólise no

plasma), sendo que o ácido articaínico também apresenta 2.5 horas de meia-vida. De uma forma geral, a meia-vida total de eliminação da articaína é considerada como sendo de 60 minutos (Snoeck, 2012). Desta forma, os tempos de exposição utilizados no presente estudo podem ser considerados plausíveis, particularmente para as concentrações menores.

Embora existam diversos estudos (Freville *et al.*, 1996; Dollo *et al.*, 1996a,b, 1998, 2000; Estebe *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2005, 2006, 2008; Moraes *et al.*, 2007a,b; Karashima *et al.*, 2007) envolvendo a complexação de moléculas de anestésicos locais com ciclodextrinas, nenhum deles empregou a articaína. Nesses estudos, a associação da HP- β -CD com anestésicos locais diversos mostrou, de uma maneira geral, propriedades mais favoráveis do que a molécula anestésica sozinha. No presente estudo, essa associação também diminuiu a citotoxicidade da articaína, de forma tempo e concentração-dependente.

7. CONCLUSÃO

A articaína livre mostrou toxicidade tempo e concentração dependentes sobre as células HaCaT. A associação à HP- β -CD diminuiu o efeito tóxico da ATC sobre a viabilidade de células HaCaT, especialmente das concentrações 0.5 e 1%.

A associação à epinefrina 1:200.000 diminuiu os efeitos tóxicos da ATC 0.5% sobre as células HaCaT, sendo que os coadjuvantes como a epinefrina, o metabisulfito de sódio e a HP- β -CD mostraram biocompatibilidade nas concentrações empregadas neste estudo.

Novos estudos sobre os metabólitos da articaína, particularmente o ácido articaínico, poderiam ajudar a esclarecer o perfil de toxicidade do anestésico local.

REFERÊNCIAS*

Araújo DR, Tsuneda SS, Cereda CMS, Carvalho FGF, Preté PSC, Fernandes SA, Yokaichiya F, Franco MK, Mazzaro I, Fraceto LF, Braga AFA, de Paula E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. *Eur J Pharm Sci.* 2008; 33: 60-71.

Araújo DR, Braga AF, Moraes CM, Fraceto LF, Paula E. Complexation of 50% enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine with cyclodextrins and spinal block anesthesia in rats. *Rev Bras Anesthesiol.* 2006; 56(5): 495-506.

Araújo DR, Fraceto LF, Braga AFA, de Paula E. Drug-delivery systems for racemic BPV (S50-R50) and BPV enantiomeric mixture (S75-R25): cyclodextrins complexation effects on sciatic nerve blockade in mice. *Rev Bras Anesthesiol* 2005; 55: 316–328.

Araújo DR, Pinto IMA, Braga AFA, de Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: Aplicações Terapêuticas. *Rev Bras Anesthesiol.* 2003; 53(5): 653-661.

Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* 1991; 32: 223-54.

Ballieul RJ, Jacobs TF, Herregods S, Vant Sint Jan P, Wyler B, Vereecke H, Almqvist F, Herregods L. The peri-operative use of intra-articular local anesthetics: a review. *Acta Anaesthesiol Belg.* 2009; 60(2):101-108.

Baluga JC. Allergy to local anesthetics in dentistry. Myth or reality? *Rev Alerg Mex* 2003; 50: 176-181.

Baroni DB, Franz-Montan M, Cogo K, Berto LA, Volpato MC, Novaes PD, Groppo FC. Effect of articaine on mental nerve anterior portion: Histological analysis in rats. *Acta Odontologica Scandinavica.* 2013; 71: 82–87.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura de periódicos conforme o Medline.

Batista da Silva C, Berto LA, Volpato MC, Ramacciato JC, Motta RH, Ranali J, Groppo FC. Anesthetic efficacy of articaine and lidocaine for incisive/mental nerve block. *J Endod.* 2010; 36(3): 438-41.

Bayat A, Kosinski RW. Methemoglobinemia in a newborn: a case report. *Pediatr Dent.* 2011; 33: 252–4.

Borg T, Modig J. Potential anti-thrombotic effects of local anesthetics due to their inhibition of platelet aggregation. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1985; 29: 739-742.

Boselli E, Duffo F, Debon R, Allaouchiche B, Chassard D, Thomas L, Portoukalian J. The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg.* 2003; 96: 755–6.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988; 106(3): 761–771.

Brunton L, Chabner B, Knollman B. Local Anesthetics. In: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* The McGraw-Hill Companies. 12th edition. 2011. p. 565-582.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15: 269–90.

Butterworth JF, Strichartz, GR. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology.* 1990; 72: 711-734.

Cartwright PD, Fyhr P. The manufacture and storage of local anesthetics. *Reg Anesth.* 1988; 13: 1-12.

Carvalho B, Clark DJ, Yeomans DC, Angst MS. Continuous subcutaneous instillation of bupivacaine compared to saline reduces interleukin 10 and increases substance P in surgical wounds after cesarean delivery. *Anesth Analg.* 2010; 111(6): 1452-9.

Cassedy JP, Phero JC, Grau EH. Epinephrine: Systemic effects and varying concentrations in local anesthesia. *Anesth Prog.* 1986; 33(6): 289-97

Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000; 26:13-25.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2005; 6(2): 329–357.

Chen AH. Toxicity and allergy to local anaesthesia. *J Calif Dent Assoc*. 1998; 26: 683–692.

Chiu CY, Lin TY, Hsia SH, Lai SH, Wong KS. Systemic anaphylaxis following local lidocaine administration during a dental procedure. *Pediatr Emerg Care*. 2004; 20: 178–80

Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997; 326: 1–16.

Connors KA. Binding constants: the measurement of molecular complex stability. 1987. Wiley, New York.

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.

Dänicke S, Hegewald AK, Kahlert S, Kluess J, Rothkötter HJ, Breves G, Döll S. Studies on the toxicity of deoxynivalenol (DON), sodium metabisulfite, DON-sulfonate (DONS) and de-epoxy-DON for porcine peripheral blood mononuclear cells and the Intestinal Porcine Epithelial Cell lines IPEC-1 and IPEC-J2, and on effects of DON and DONS on piglets. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(8-9): 2154-62.

Das G. Cocaine abuse in North America: a milestone in history. *J Clin Pharmacol*. 1993; 33: 296-310.

Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3(12): 1023-35.

De Matos Alves Pinto L. Desenvolvimento de formulações anestésicas locais de longa duração. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Biologia

Funcional e Molecular na área de Bioquímica. Campinas – São Paulo – Brasil. 2002

de Paula E, Cereda CM, Fraceto LF, de Araújo DR, Franz-Montan M, Tofoli GR, Ranali J, Volpato MC, Groppo FC. Micro and nanosystems for delivering local anesthetics. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012; 9(12): 1505-24.

de Paula E, Cereda CM, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, de Araújo DR. Drug delivery systems for local anesthetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2010; 4(1): 23-34.

de Paula E, Shreier, S. Molecular and physico chemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz J Med Biol Res*. 1996; 29: 877-894.

Department of Veterans Affairs. Pain as the 5th Vital Sign Toolkit. Revised Edition, USA; 2000.

Ranali J, Volpato MC. Anestesiologia. Em: Dias de Andrade E, Groppo FC, Volpato MC, Rosalen P, Ranali J ed. *Odontologia Essencial Parte Básica: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica*. Capítulo 2. Editora Artes Médicas Ltda: São Paulo; 2013. p. 74-112.

Dias de Andrade E, Volpato M, Ranali J. Pacientes que requerem cuidados adicionais. Em: Dias de Andrade E Ed. *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia*. Capítulo 11. Editora Artes Medicas Ltda: Ed. Sao Paulo; 2006. p.117-158.

Dollo G, Le Corre P, Freville JC, Chevanne F, LeVerge R. Biopharmaceutics of local anesthetic-cyclodextrin complexes following loco-regional administration. *Ann Pharm Fr*. 2000; 58: 425–432.

Dollo G, Thompson DO, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Inclusion complexation of amide-type local anesthetics with β -cyclodextrin and derivatives III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- β -CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. *Int J Pharm* 1998; 164: 11-19.

Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with β -cyclodextrin and its derivatives I. Physicochemical characterization. *Int J Pharm.* 1996a; 131: 219–228.

Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with β -cyclodextrin and its derivatives II. Evaluation of affinity constants and in vitro transfer rate constants. *Int J Pharm.* 1996b; 131: 219–228.

Dragoo JL, Korotkova T, Kim HJ, Jagadish A. Chondrotoxicity of low pH, epinephrine and preservatives found in local anesthetics containing epinephrine. *Am J Sports Med.* 2010; 38(6): 1154-9.

Elad S, Admon D, Kedmi M, Naveh E, Benzki E, Ayalon S, Tuchband A, Lutan H, Kaufman E. The cardiovascular effect of local anesthesia with articaine plus 1:200.000 adrenalin versus lidocaine plus 1:100.000 adrenalin in medically compromised cardiac patients: a prospective, randomized, double blinded study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(6): 725-30.

El-Kholey KE. Infiltration anesthesia for extraction of the mandibular molars. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013; 71(10): 1658

Estebe JP, Ecoffey C, Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Bupivacaine pharmacokinetics and motor blockade following epidural administration of the bupivacaine- sulfobutylether -7- β -cyclodextrin complex in sheep. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2002; 19: 308–310.

Fedder C, Beck-Schimmer B, Aguirre J, Hasler M, Roth-Z'graggen B, Urner M, Kalberer S, Schlicker A, Votta-Velis G, Bonvini JM, Graetz K, Borgeat A. *In vitro* exposure of human fibroblasts to local anesthetics impairs cell growth. *Clin Exp Immunol* 2010; 162: 280–8

Ferger P, Marxkors K. Ein neues Anästhetikum in der Zahnärztlichen Prothetik. *Dtsch Zahnarzl Z.* 1973; 28: 87–89.

Fernandes L, Gonçalves M, Moraes C, Araujo D, Zanella L, de Paula E, Pertinhez T. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaina- β -ciclodextrina. *Quim Nova* 2007; 30(5): 1203-1207.

Ford DJ, Raj PP. Peripheral neurotoxicity of 2-chloroprocaine and bisulfite in the cat. *Anesth Analg*. 1987; 66: 719–22

Fréville JC, Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Controlled systemic absorption and increased anesthetic effect of bupivacaine following epidural administration of bupivacaine-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Pharm. Res.* 1996; 13: 1576–1580.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001; 294: 1871–5.

Fyhr P, Brodin A. The effect of anaerobic conditions on epinephrine stability. *Acta Pharma Suecica*. 1987; 24: 89-96.

Garisto GA, Gaffen AS, Lawrence HP, Tenenbaum HC, Haas DA. Occurrence of paresthesia after dental local anesthetic administration in the United States. *J Am Dent Assoc*. 2010; 141: 836-844.

Gerner P, Strichartz GR. Sensory and motor complications of local anesthetics. *Muscle Nerve*. 2008; 37: 421–425.

Gissen A. Toxicity of local anesthetics in obstetrics: II. Chloroprocaine: Research and clinical aspects. *Clin Anesthesiol*. 1986; 4: 101–8

Gissen A, Datta S, Lambert D. The chloroprocaine controversy: II. Is chloroprocaine neurotoxic? *Reg Anesth*. 1984; 9: 135–44

Grant GJ, Bansinath M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med*. 2001; 26: 61-63.

Gold MS, Reichling DB, Hampl KF, Drasner K, Levine JD. Lidocaine toxicity in primary afferent neurons from the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 285:413–21.

Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl Beta Cyclodextrin: A Toxicological Review. *Food and Chemical Toxicology*. 2005; 43: 1451–1459.

Grando SA. Biological functional of keratinocyte cholinergic receptor. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1997; 2: 41–48.

Grishko V, Xu M, Wilson G, Pearsall AW 4th. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am*. 2010; 92(3): 609-18.

Gröger H, Schmidt-Wyklicky G. Carl Koller und die Entdeckung der Lokalanästhesie 1884. *Spektrum der Augenheilkunde* 2012; 26(6): 309-311.

Grouselle M, Tueux O, Dabadie P, Georgescaud D, Mazat JP. Effect of local anesthetics on mitochondrial membrane potential in living cells. *Biochem J* 1990; 271: 269-72.

Guo X, Castle NA, Chernoff DM, Strichartz GR. Comparative inhibition of voltage-gated cation channels by local anesthetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991; 625: 181-199.

Haas DA. Articaine and paresthesia: epidemiological studies. *J Am Coll Dent*. 2006; 73(3): 5–10.

Haas DA, Lennon D. A 21 year retrospective study of reports of paresthesias following local anesthetic administration. *J Can Dent Assoc*. 1995; 61: 319-330.

Hajratwala BR. Kinetics of sulfite-induced anaerobic degradation of epinephrine. *J Pharm Sci*. 1975; 64: 45-48.

Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*. 2002; 23(3): 144-50.

Hashimoto K, Hampl KF, Nakamura Y, Bollen AW, Feiner J, Drasner K. Epinephrine increases the neurotoxic potential of intrathecally administered lidocaine in the rat. *Anesthesiology*. 2001; 94: 876-881.

Herlaar E, Brown Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today*. 1999; 5(10): 439-47.

Hersh EV. The pharmacokinetics and cardiovascular effects of high-dose articaine with 1:100.000 and 1:200.000 epinephrine. *JADA*. 2006; 137(11): 1562-71.

Hersh EV, Condouris GA, Havelin D. Actions of intrathecal chlorprocaine and sodium bisulfite on rat spinal reflex function utilizing a noninvasive technique. *Anesthesiology*. 1990; 72:1077-82.

Hillerup S, Bakke M, Larsen JO, Thomsen CE, Gerds TA. Concentration dependent neurotoxicity of articaine: an electrophysiological and stereological study of the rat sciatic nerve. *Anesth Analg*. 2011a; 112(6): 1330-8.

Hillerup S, Jensen RH, Ersbøll BK. Trigeminal nerve injury associated with injection of local anesthetics: needle lesion or neurotoxicity? *J Am Dent Assoc*. 2011b; 142(5): 531-9.

Hirata M, Sakaguchi M, Mochida C, Sotozono C, Kageyama K, Kuroda Y, Hirose M. Lidocaine inhibits tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor and suppresses proliferation of corneal epithelial cells. *Anesthesiology*. 2004; 100: 1206-10.

Hirota K, Smart D, Lambert DG. The effects of local and intravenous anesthetics on recombinant rat VR1 vanilloid receptors. *Anesthesia and Analgesia*. 2003; 96(6): 1656-1660.

Hoellein L, Holzgrabe U. Ficts and facts of epinephrine and norepinephrine stability in injectable solutions. *Int J Pharm*. 2012; 15(434): 468-80.

Hollmann MW, Strumper D, Herroeder S, Durieux ME. Receptors, G proteins, and their interactions. *Anesthesiology*. 2005; 103(5): 1066-1078.

Hollmann MW, Gross A, Jelacin N, Durieux ME. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology*. 2001; 95(1): 113-122.

Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology*. 2000; 93(3): 858-75.

Hondrum S, Ezell J. The relationship between pH and concentrations of antioxidants and vasoconstrictors in local anesthetic solutions. *Anesth Prog.* 1996; 43: 85-91.

Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sc.* 1997; 86(2): 147–162.

Jacobs TF, Vansintjan PS, Roels N, Herregods SS, Verbruggen G, Herregods LL *et al* . The effect of lidocaine on the viability of cultivated mature human cartilage cells: an *in vitro* study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011; 19(7): 1206-13.

Jaegera A, Weissa D, Jonas L, Kriehubera R. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology.* 2012; 296: 27-36.

Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: 739-44.

Jakob W. Local anaesthesia and vasoconstrictive additional component. *Newslett Int Fed Dent Anesthesiol Soc.* 1989; 2:1.

Johnson ME, Uhl CB, Spittler KH, Wang H, Gores GJ. Mitochondrial injury and caspase activation by the local anesthetic lidocaine. *Anesthesiology.* 2004; 101: 1184–94.

Johnson ME, Saenz JA, Da Silva AD, *et al*. Effect of local anesthetics on neuronal cytoplasmic calcium and plasma membrane lysis (necrosis) in a cell culture model. *Anesthesiology.* 2002; 97: 1466-77.

Johnson RB, Dowse CM. Comparative effects of local anesthetic preparations on gingival fibroblasts of the rat. *J Dent Res* 1986; 65:1125–32

Kaba A, Laurent SR, Detroz BJ, *et al*. Intravenous lidocaine infusion facilitates acute rehabilitation after laparoscopic colectomy. *Anesthesiology.* 2007; 106(1): 11–18.

Kalichman MW, Powell HC, Reisner LS, Myers RR: The role of 2-chloroprocaine and sodium bisulfite in rat sciatic nerve edema. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1986; 45: 566-75.

Kambalimath DH, Dolas RS, Kambalimath HV, Agrawal SM. Efficacy of 4 % Articaine and 2 % Lidocaine: A clinical study. *J Maxillofac Oral Surg.* 2013; 12(1): 3-10.

Kamiya Y, Ohta K, Kaneko Y. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed Res.* 2005; 26: 231-239.

Kämmerer PW, Seeling J, Alshihri A, Daubländer M. Comparative clinical evaluation of different epinephrine concentrations in 4 % articaine for dental local infiltration anesthesia. *Clin Oral Investig.* 2013a; 6: 1010-7.

Kämmerer PW, Krämer N, Esch J, Pfau H, Uhlemann U, Piehlmeier L, Daubländer M. Epinephrine-reduced articaine solution (1:400,000) in paediatric dentistry: a multicentre non-interventional clinical trial. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2013b; 14(2): 89-95.

Karashima K, Taniguchi M, Nakamura T, Takasaki M, Matsuo K, Irikura M, Irie T. Prolongation of intrathecal and sciatic nerve blocks using a complex of levobupivacaine with maltosyl-beta-cyclodextrin in rats. *Anesth Analg.* 2007; 104: 1121-1128.

Drasner K. Local Anesthetics. In: Katzung B, White P ed. *Basic and Clinical Pharmacology.* Chapter 26. The McGraw-Hill Inc: USA; 2009. p. 439-450.

Keck M, Zeyda M, Gollinger K, Burjak S, Kamolz LP, Frey M *et al* . Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation into adipocytes. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 126(5): 1500-5.

Kelly JR, Dalm GW: Stability of epinephrine in dental anesthetic solutions: implications for autoclave sterilization and elevated temperature storage. *Mil Med* 1985; 150:112-114.

Komatsu T, Takenami T, Nara Y, Yagishita S, Kurashige C, Okamoto H, Yago K. Epinephrine administered with lidocaine solution does not worsen intrathecal lidocaine neurotoxicity in rats. *Reg Anesth Pain Med*. 2013; 38(2): 140-4.

Kumar V, Abbas A, Fausto N. Adaptações celulares, dano e morte celular. Inflamação aguda e crônica. Em: Robbins e Cotran ed. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. Capítulos 1 e 2. Elsevier: RJ- Brazil; 2005. p. 3-86

Lai KB, Sanderson JE, Yu CM. High dose norepinephrine-induced apoptosis in cultured rat cardiac fibroblast. *Int J Cardiol*. 2009; 136(1): 33-9.

Lima HO. Estudo da encapsulação de fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose em lipossomas e ciclodextrinas. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP. 2001.

Lintner CJ. Stability of pharmaceutical products. In: Osol A, ed: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th ed. Easton, PA, Mack Publishing. 1980: 1425-1433.

Little JW. The impact in dentistry of recent advances in the management of hypertension. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90(5): 591-9.

Little JW, Falace D, Miller C. *Dental Management of the Medically Compromised Patient* (ed. 6). Philadelphia, PA, Elsevier Science. 2002; p64.

Liu CM, Huang FM, Yang LC, Chou LS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxic effects on gingival retraction cords on human gingival fibroblasts *in vitro*. *J Oral Rehabil*. 2004; 31(4): 368-72.

Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm*. 2007; 329: 1-11.

Loftsson T, Jarho P, Másson M, Järvinen T. Cyclodextrins in Drug Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2005; 2(2): 335-351.

Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm*. 2001; 225: 15-30.

Loukas YL, Vraka V, Gregoriadis G. Drugs, in cyclodextrins, in liposomes: a novel approach to the chemical stability of drugs sensitive to hydrolysis. *Int J Pharm* 1998; 162:137-142

Lukawska J, Caballero M, Tsabouri S, Dugué P. Hypersensitivity to local anaesthetics – 6 facts and 7 myths. *Current Allergy & Clinical Immunology*. 2009; (22)3: 117-120

McCormack B, Gregoriadis G. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs *in vivo*. *Int J Pharm*. 1998; 162: 59-69.

Malamed SF. Pharmacology of Local Anesthetics and Vasoconstrictors. In: Malamed SF ed. *Handbook of local anesthesia*. Chapters 2 and 3. Mosby: St Louis; 2004. p. 27-54

Malamed SF, Gagnon S, Leblanc D. Articaine hydrochloride: a study of the safety of a new amide local anesthetic. *J Am Dent Assoc*. 2001; 132: 177–85.

Mather LE, Tucker GT. Properties, absorption, and disposition of local anesthetic agents. In: Cousins MJ, Carr DB, Horlocker TT, Bridenbaugh PO, editors. *Neural Blockade in Clinical Anesthesia and Pain Medicine*, 4th ed. Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia; 2009. p. 48–95.

Matioli G. *Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais*, Ed. Eduem. Maringá, 2000.

McEntire M, Nusstein J, Drum M, Reader A, Beck M. Anesthetic efficacy of 4% Articaine with 1:100.000 epinephrine versus 4% articaine with 1:200.000 epinephrine as a primary buccal infiltration in the mandibular first molar. *J Endod*. 2011; 37(4): 450-4.

McLure HA, Rubin AP. Review of local anesthetics agents. *Minerva Anesthesiol*. 2005; 71: 59-74.

Meechan JG. Infiltration anesthesia in the mandible. *Dent Clin North Am*. 2010; 54(4): 621-9

Mercado P, Weinberg G. Local Anesthetic System Toxicity: Prevention and Treatment. *Anesthesiology Clin.* 2011; 29: 233-242.

Milano EA, Waraszkiewicz SM, Dirubio R: Aluminum catalysis of epinephrine degradation in lidocaine hydrochloride with epinephrine solutions. *J Parenter Sci Technol.* 1982; 36: 232-236.

Mojumdar EH, Lyubartsev AP. Molecular dynamics simulations of local anesthetic articaine in a lipid bilayer. *Biophysical Chemistry.* 2010; 153(1): 27–35.

Moore PA, Haas DA. Paresthesias in dentistry. *Dent Clin North Am.* 2010; 54(4):715-30.

Moore PA, Hersh EV. Oral paresthesia. *J Am Dent Assoc.* 2010; 141(11): 1300-1.

Moraes CM, Abrami P, Araújo DR, Braga AFA, Issa MG, Ferraz HG, de Paula E, Fraceto LF. Characterization of lidocaine: hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2007a; 57: 313–316.

Moraes CM, Abrami P, de Paula E, Braga AFA, Fraceto LF. Study of the interaction between S(-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Pharm.* 2007b; 331: 99–106.

Moraes CM, Abramil P, Gonçalves MM, Filho NA, Fernandes AS, de Paula E, Fraceto LF. Preparation and physico-chemical characterization of inclusion complexes between local anesthetics and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Quím Nova.* 2007c; 30(4): 777-784.

Nau C, Wang GK. Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na⁺ channels. *J Membr Biol.* 2004; 201(1): 1-8.

Neal JM. Effects of epinephrine in local anesthetics on the central and peripheral nervous systems: neurotoxicity and neural blood flow. *Reg Anesth Pain Med.* 2003; 28: 124-134.

- Nishiguchi E, Hamada N, Shindo J. Lidocaine action and conformational changes in cytoskeletal protein network in human red blood cells. *Eur J Pharmacol.* 1995; 286: 1–8
- Nishina K, Mikawa K, Morikawa O, Obara H, Mason RJ. The effects of intravenous anesthetics and lidocaine on proliferation of cultured type II pneumocytes and lung fibroblasts. *Anesth Analg.* 2002; 94: 385-8
- Nizharadze N, Mamaladze M, Chipashvili N, Vadachkoria D. Articaine - the best choice of local anesthetic in contemporary dentistry. *Georgian Med News.* 2011; 190: 15-23.
- Nouette-Gaulain K, Dadure C, Morau D, *et al.* Age dependent bupivacaine-induced muscle toxicity during continuous peripheral nerve block in rats. *Anesthesiology.* 2009; 111(5): 1120–1127.
- Paxton K, Thome DE. Efficacy of articaine formulations: quantitative reviews. *Dent Clin North Am.* 2010; 54(4): 643-53.
- Peck SL, Johnston RB, Horwitz LD. Reduced neutrophil superoxide anion release after prolonged infusion of lidocaine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985; 235: 418–22.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* 2008; 72: 157-165.
- Pellicer-Chover H, Cervera-Ballester J, Sanchis-Bielsa JM, Peñarrocha-Diago MA, Peñarrocha-Diago M, García-Mira B. Comparative split-mouth study of the anesthetic efficacy of 4% articaine versus 0.5% bupivacaine in impacted mandibular third molar extraction. *J Clin Exp Dent.* 2013; 5(2): 66-71.
- Pena SD, Karpati G, Carpenter S, Hechtman P. Effects of lidocaine on the lysosomes of cultured skin fibroblasts. *Cell Biol Int Rep.* 1982; 6: 807–13
- Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, Rosenberg A, Recio-Pinto E, Zhang J, Blanck TJ, Xu F. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesth Analg.* 2009; 108(3): 997-1007.

Perusse R, Goulet J, Turcotte J. Contraindications to vasoconstrictors in dentistry part I: cardiovascular diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 74: 687-91.

Pescosolido N, Scarsella G, Tafani M, Nebbioso M. Cataract surgery complications: an *in vitro* model of toxic effects of ropivacaine and lidocaine. *Drugs.* 2011; 11: 303–7

Pierzchalska M, Michalik M, Stepień E, Korohoda W. Changes in morphology of human skin fibroblasts induced by local anesthetics: role of actomyosin contraction. *Eur J Pharmacol.* 1998; 358: 235–44

Pogrel MA. Permanent nerve damage from inferior alveolar nerve blocks: a current update. *J Calif Dent Assoc.* 2012; 40(10): 795-7.

Pogrel MA. Permanent nerve damage from inferior alveolar nerve blocks – an update to include articaine. *J Calif Dent Assoc.* 2007; 35: 271–273.

Power I. An update on analgesics. *Br J Anaest.* 2011; 107(1): 19–24.

Ranjbar SA, Rajabi O, Salari R, Ashraf H. Lidocaine Cyclodextrin complex Ophthalmic Drop, a New Topical Anesthetic Choice. *Iran Red Crescent Med J.* 2012; 14(9): 569-73.

Ravid A, Rubinstein E, Gamady A, Rotem C, Liberman UA, Koren R. Vitamin D inhibits the activation of stress-activated protein kinases by physiological and environmental stresses in keratinocytes. *J Endocrinol.* 2002; 173(3): 525-32.

Ribeiro PD Jr, Sanches MG, Okamoto T. Comparative analysis of tissue reactions to anesthetic solutions: histological analysis in subcutaneous tissue of rats. *Anesth Prog.* 2003; 50: 169–80.

Rood JP. Adverse reactions to dental local anaesthetic injection – ‘allergy’ is not the cause. *Br Dent J.* 2000; 189: 380–384.

Roquette-Pharma. Hydroxypropyl Betacyclodextrin: An Enabling Technology for Challenging Pharmaceutical Formulations. 2009. In: <http://www.roquette->

pharma.com/media/deliacms/media/62/6297-36fb33.pdf. Accessed on 04-02-2014.

Rose L, Mealey B, Minks L, Cohen W. Oral care for patients with cardiovascular disease and stroke. *JADA*. 2002; 133: 37S-44S.

Sack U, Kleemann PP. Intraoral conduction anesthesia with epinephrine-containing local anesthetics and arterial epinephrine plasma concentration. *Anesth Pain Control Dent*. 1992; 1: 77–80.

Sambrook PJ, Goss AN. Severe adverse reactions to dental local anaesthetics: prolonged mandibular and lingual nerve anaesthesia. *Aust Dent J*. 2011; 56(2): 154-9.

Sanchez GA, Takara D, Alonso GL. Local anesthetics inhibit Ca-ATPase in masticatory muscles. *J Dent Res*. 2010; 89: 372–7

Santos CF, Modena KC, Giglio FP, Sakai VT, Calvo AM, Colombini BL, Sipert CR, Dionísio TJ, Faria FA, Trindade AS Jr, Lauris JR. Epinephrine concentration (1:100,000 or 1:200,000) does not affect the clinical efficacy of 4% articaine for lower third molar removal: a double-blind, randomized, crossover study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65(12): 2445-52.

Seravalli E, Lear E. Toxicity of chloroprocaine and sodium bisulfite on human neuroblastoma cells. *Anesth Analg*. 1987; 66(10): 954-8.

Shipton E. New Formulations of Local Anaesthetics—Part I. *Anesthesiology Research and Practice*. 2012; 01-11.

Sixsmith DG, Watkins WM, Kokwaro GO: The stability of adrenaline ophthalmic solutions on sterilization and storage. *J Clin Hosp Pharm*. 1982; 7: 205-207.

Snoeck M. Articaine: a review of its use for local and regional anesthesia. *Local and Regional Anesthesia*. 2012; 5: 23–33.

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.

Sun X, Garlid KD. On the mechanism by which bupivacaine conducts protons across the membranes of mitochondria and liposomes. *J Biol Chem.* 1992; 267: 19147–54.

Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev.* 2002; 54: 101-127.

Taniguchi M, Bollen A, Drasner K. Sodium Bisulfite – Scapegoat for chloroprocaine neurotoxicity? *Anesthesiology.* 2004; 100: 85–91.

Thoma K, Struve M: Untersuchungen zur photo- und thermostabilität von adrenalin-losungen. *Pharm Acta Helv.* 1986; 61: 2-9.

Tily FE, Thomas S. Glycemic effect of administration of epinephrine-containing local anaesthesia in patients undergoing dental extraction, a comparison between healthy and diabetic patients. *Int Dent J.* 2007; 57(2): 77-83.

Tófoli GR, Ramacciato JC, de Oliveira PC, Volpato MC, Groppo FC, Ranali J. Comparison of effectiveness of 4% articaine associated with 1:100.000 or 1:200.000 epinephrine in inferior alveolar nerve block. *Anesth Prog.* 2003; 50(4): 164-8.

Tortamano IP, Siviero M, Lee S, Sampaio RM, Simone JL, Rocha RG. Onset and duration period of pulpal anesthesia of articaine and lidocaine in inferior alveolar nerve block. *Braz Dent J.* 2013; 24(4): 371-4.

Trissel LA, ed: *Handbook on Injectable Drugs*, 16th ed. Bethesda, MD, American Society of Health-System Pharmacists, 2011.

Udelmann A, Rodolfo de Sá Lorena SE, Girioli SU, Silva WA, Moraes AC. Efeitos hemodinâmicos da intoxicação aguda com bupivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50%: estudo experimental em suínos. *Rev Bras Anest.* 2007; 57(1): 63-73.

Venturini CG, Nicolini J, Machado C, Machado VG. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova.* 2008; 31(2):360-8.

Villarruel EQ, Borda E, Sterin-Borda L, Orman B. Lidocaine-induced apoptosis of gingival fibroblasts: participation of cAMP and PKC activity. *Cell Biol Int.* 2011; 35: 783–8

Volpato M, Ranali J, Dias de Andrade E. Anestesia Local. Em: Dias de Andrade ed. *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia*. 2da Ed. Artes Medicas: São Paulo; 2006. p. 35-45.

Volpi M, Shaafi RI, Epstein PM, *et al.* Local anesthetics, mepacrine and propranolol are antagonists of calmodulin. *Proc Natl Acad Sci.* 1981; 78: 795-799.

Vree TB, Gielen MJ. Clinical pharmacology and the use of articaine for local and regional anaesthesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2005; 19: 293–308.

Wang CF, Pancaro C, Gerner P, Strichartz G. Prolonged suppression of postincisional pain by a slow-release formulation of lidocaine. *Anesthesiology.* 2011; 114(1): 135-149.

Werdehausen R, Braun S, Fazeli S, Hermanns H, Hollmann MW, Bauer I, Stevens MF. Lipophilicity but not stereospecificity is a major determinant of local anaesthetic-induced cytotoxicity in human T-lymphoma cells. *Eur J Anaesthesiol.* 2012; 29(1): 35-41.

Werdehausen R, Braun S, Hermanns H, Kremer D, Küry P, Hollmann MW, Bauer I, Stevens MF. The Influence of Adjuvants Used in Regional Anesthesia on Lidocaine-Induced Neurotoxicity *In Vitro*. *Reg Anesth Pain Med.* 2011; 36(5): 436-43.

Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, Hermanns H, Essmann F, Hollmann MW, Bauer I, Stevens MF. Apoptosis induction by different local anesthetics in a neuroblastoma cell line. *Br J Anaesth.* 2009; 103: 711–8

Werdehausen R, Braun S, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Walczak H, Lipfert P *et al.* Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology.* 2007; 107(1): 136-43.

Wiles MD, Nathanson MH. Local anaesthetics and adjuvants-future developments. *Anaesthesia*. 2010; 65(1): 22-37.

Williams JV, Williams LR, Colbert SD, Revington PJ. Amaurosis, ophthalmoplegia, ptosis, mydriasis and periorbital blanching following inferior alveolar nerve anaesthesia. *Oral Maxillofac Surg*. 2011; 15: 67–70

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Ver Cytol*. 1980; 68: 251–306.

Xiong Z, Strichartz GR. Inhibition by local anesthetics of Ca²⁺ channels in rat anterior pituitary cells. *Eur J Pharm*. 1998; 363(1): 81–90.

Xu F, Zhang J, Recio-Pinto E, Blanck TJ. Halothane and isoflurane augment depolarization-induced cytosolic Ca²⁺ transients and attenuate carbachol stimulated Ca²⁺ transients. *Anesthesiology*. 2000; 92: 1746–56.

Yagiela JA. Anestésicos Locais. Em: Yagiela JA, Dowd FJ, Johnson BS, Mariotti AJ, Neidle EA. *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*. Capítulo 16. Elsevier Editora Ltda: São Paulo; 2011. p. 243-26.

Yarov-Yarovoy V, McPhee JC, Idsvoog D, *et al*. Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the sodium channel α subunit in voltage-dependent gating and drug block. *J Biol Chem*. 2002; 277: 35393-35401.

Yu Y, K Chadee. Prostaglandin E₂ stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol*. 1998; 161: 3746-3752.

Zaric D, Christiansen C, Pace NL, Punjasawadwong Y. Transient neurologic symptoms (TNS) following spinal anaesthesia with lidocaine versus other local anaesthetics. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005; 2: CD003006.

Zhu QG, Hu JH, Liu JY, Lu SW, Liu YX, Wang J. Stereo selective characteristics and mechanisms of epidermal carboxylesterase metabolism observed in HaCaT keratinocytes. *Biol Pharm Bull*. 2007; 30(3): 532-6.