



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

BEATRIZ PERTILLE NEGRI

**AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO DE TETRACAÍNA ENCAPSULADA
EM CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS EM
HIDROGÉIS TERMORREVERSÍVEIS ATRAVÉS DA PELE**

PIRACICABA

2019

BEATRIZ PERTILLE NEGRI

**AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO DE TETRACAÍNA ENCAPSULADA
EM CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS EM
HIDROGÉIS TERMORREVERSÍVEIS ATRAVÉS DA PELE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof^a Dra. Michelle Franz-Montan Braga Leite

Coorientador: Ma. Jaiza Samara Macena de Araújo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA BEATRIZ PERTILLE NEGRI E ORIENTADA PELA PROFA DRA MICHELLE FRANZ MONTAN BRAGA LEITE

PIRACICABA

2019

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

N312a Negri, Beatriz Pertille, 1997-
Avaliação da permeação de tetracaína encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados em hidrogéis termorreversíveis através da pele / Beatriz Pertille Negri. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Michelle Franz Montan Braga Leite.
Coorientador: Jaiza Samara Macena de Araújo.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anestésicos locais. 2. Tetracaína. 3. Adesivo transdérmico. 4. Hidrogéis. I. Franz-Montan, Michelle, 1982-. II. Araújo, Jaiza Samara Macena de, 1990-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Local anesthetics

Tetracaine

Transdermal patch

Hydrogels

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que tornou possível o sonho acontecer.

Em segundo lugar dedico esta conclusão de curso a meus pais, Edilene Pertille Negri e Antônio Fábio Negri, que deram tudo de si para que meu sonho pudesse se tornar realidade. Obrigada por estarem comigo em todos os momentos.

À minha avó, Idalina Bomback Negri, a qual ajudou imensamente na minha criação, fundou as bases do meu caráter e me mostrou o quanto é necessário batalhar na vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me guiado nos momentos difíceis e ter me mantido confiante durante toda trajetória.

A meus pais, pela oportunidade me dada de realizar o curso, por terem se mantido firmes e me dando apoio. Não há palavras no mundo que possam expressar tamanha gratidão.

Aos meus fiéis escudeiros, parceiros de graduação e aqueles que posso chamar de amigos: Letícia Rodrigues Pereira, Larissa Bizarre, Leonardo Pagotto, João Pedro Galli Poleti e Fernando Augusto Gonçalves. Acreditem, não teria sido tão divertido sem vocês.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Marcelo Knobel, por ter me proporcionado a realização do curso, e ter garantido as instalações para a conclusão deste curso.

À Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite, minha orientadora, pela oportunidade e apoio na realização deste trabalho, mesmo que estivesse de licença maternidade durante a realização da iniciação científica e a elaboração do trabalho de conclusão de curso.

À Ma. Jaiza Samara Macena de Araújo e ao Dr. Bruno Vilela Muniz, co-orientadores deste trabalho, por todo esforço em garantir excelência do mesmo, e por garantir uma ótima experiência no laboratório.

À Ma. Stephany Di Carla Santos e ao Ms. Klinger De Souza Amorim, pela constante presença no laboratório e os ensinamentos passados. Ao técnico de laboratório Fábio Vinicius Padilha, que esteve sempre disponível e muito solícito.

À Prof. Eneida de Paula, do Instituto de Biologia da Unicamp, coordenadora deste auxílio temático, pela oportunidade, estrutura do laboratório e materiais utilizados para o preparo das formulações avaliadas neste trabalho.

À Ma. Simone Ramos de Castro, do Instituto de Biologia da Unicamp, pelo preparo das formulações testadas neste estudo

A todos os docentes da instituição, que carregam nas costas o peso da nossa formação.

Aos pós-graduandos da FOP por todo conhecimento me passado ao longo desses 5 anos de curso de graduação. Sem vocês, nada seria possível.

Agradeço também a cada funcionário, que tanto nos auxiliaram e até mesmo, consolaram, quando os dias não eram tão bons.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo auxílio financeiro por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq) disponibilizado para que esta pesquisa acontecesse.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido para realização deste trabalho (Projeto Temático processo nº 2014/14457-5).

RESUMO

Distúrbios temporomandibulares (DTMs) causam dor em muitos pacientes. Esses distúrbios ainda não possuem uma estratégia terapêutica analgésica eficaz. Portanto, o desenvolvimento de novas formulações para controle de dor pode trazer conforto aos pacientes acometidos. O uso de anestésicos tópicos pode ser uma opção para o controle da dor aguda associada às DTMs, porém estes apresentam reduzida permeabilidade quando aplicados topicamente em pele. Já foi demonstrado que carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) pode aumentar a absorção transdérmica de diferentes grupos de fármacos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de permeação transdérmica de tetracaína 4% encapsulada ou não em CLN, através da pele da orelha de porco, visando uma futura aplicação *in vivo*. O experimento foi realizado em células de difusão vertical tipo *Franz*. Em intervalos predeterminados foram coletadas alíquotas da solução receptora e a tetracaína foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A partir da quantidade permeada *versus* o tempo foi obtido o perfil de permeação da tetracaína e foram calculados os parâmetros fluxo (velocidade) e tempo de latência (tempo para início) da permeação. A tetracaína apresentou perfil sustentado de liberação com fluxo significativamente menor (teste t não pareado; $p < 0,05$) na formulação encapsulada em CLN ($177,97 \pm 49,76 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$) quando comparada à não encapsulada ($223,89 \pm 27,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$). Conclui-se que o perfil sustentado de permeação através da pele apresentado pela tetracaína encapsulada em CLN pode resultar em retenção prolongada do fármaco no sítio de ação, e pode resultar em uma ação antiálgica duradoura no controle da dor em pacientes acometidos com DTMs.

Palavras-chave: Anestésicos locais. Tetracaína. Transdérmico. Hidrogéis.

ABSTRACT

Temporomandibular disorders (TMD) have great clinical importance because its high prevalence. These disorders still does not have a particular or resolute therapeutic strategy. Therefore, it is necessary to study and develop new strategies in order to bring comfort to the affected patients. One possibility would be the use of topical anesthetics for the management of critical pain associated with TMD; however, these have low skin permeation when topically applied. It has been showed that nanostructured lipid carriers (NLC) increase transdermal absorption of different drug groups. The aim of this study was to evaluate the transdermal permeation capacity of 4% tetracaine encapsulated or not in NLC through the swine ear skin, for future *in vivo* application. The experiment was carried out in *Franz* vertical diffusion cells. At predetermined intervals, samples were withdrawn of the receptor solution and tetracaine were quantified by High Performance Liquid Chromatography. From the permeated amount *versus* time, tetracaine permeation profile was used and the permeation parameters flow (velocity) and latency (onset time) were calculated. Tetracaine presented significantly lower sustained release profile (unpaired test; $p < 0.05$) on NLC encapsulated formulation ($177,97 \pm 49,76 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) compared to not encapsulated ($223,89 \pm 27,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$). It can be concluded that tetracaine NLC-encapsulated sustained permeation profile might offer prolonged retention of the drug at the site of action, which also might result in longer lasting antialgic action in pain control of TMD.

Key words: Local anesthetics. Tetracaine. Transdermal. Hydrogel.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
3 PROPOSIÇÃO	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Formulações a serem estudadas	17
4.2 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo tetracaína	17
4.3 Preparo das formulações de hidrogéis de poloxamer 407	18
4.4 Metodologia analítica para quantificação de tetracaína por cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE)	18
4.5 Preparo da pele para os ensaios de permeação	19
4.6 Ensaio de solubilidade do AL – determinação da solução receptora nos ensaios de permeação	20
4.7 Ensaio de permeação <i>in vitro</i> das formulações através de pele de orelha de porco em célula de difusão vertical tipo Franz	21
5 RESULTADOS	23
5.1 Validação da metodologia analítica e teor	23
5.2 Ensaio de permeação através de pele de orelha	23
6 DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS	33
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	33
Anexo 2 – Iniciação Científica	34

1 INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular (ATM) é responsável por articular a mandíbula com o crânio, de modo mais específico, o processo condilar da mandíbula na fossa mandibular do osso temporal, interposto pelo disco articular, o qual é suportado pelos ligamentos temporomandibular, esfenomandibular e estilomandibular (Madeira, 2015). As distúrbios temporomandibulares (DTMs) abrangem as dores nessa articulação e também nos músculos mastigatórios quando há anormalidades no relacionamento entre suas estruturas (Scrivani et al., 2008; Cairns, 2010). Os sintomas que caracterizam às DTMs são dores mal localizadas, que podem ser referidas para outras regiões da cabeça e pescoço (Cairns, 2010), além disso, pode ocorrer limitação de abertura bucal com dificuldade na mastigação e ruídos na articulação, o que afeta a qualidade de vida dos pacientes acometidos (Scrivani et al., 2008).

Nos dias de hoje, as dores relacionadas às DTMs são tratadas de forma empírica, com a utilização de farmacoterapia de diferentes classes de fármacos (anti-inflamatórios não esteroidais, corticoides, relaxantes musculares, ansiolíticos, opioides ou até, antidepressivos tricíclicos), fisioterapia, e em alguns casos, cirurgia. Todavia, a eficácia desses medicamentos não tem muitas evidências (Cairns, 2010; Scrivani et al., 2008; Graff-Radford e Bassiur, 2014). Os anestésicos locais (AL) também seriam uma classe de fármacos interessante para aplicação no controle da dor decorrente das DTMs, por bloquear a nocicepção, já que bloqueiam os canais de sódio e não há despolarização dos neurônios nem condução do impulso nervoso após estímulo nociceptivo, não ocorrendo a percepção dolorosa (De Andrade, 2014).

A administração de um anestésico tópico com alta penetração tecidual capaz de promover o alívio da dor de estruturas profundas, como a ATM seria de grande interesse para pacientes com sintomatologia dolorosa relacionada com as DTMs. Uma formulação tópica anestésica considerada ideal deve promover anestesia em curto período de latência, quando aplicada na pele intacta e apresentar duração prolongada do seu efeito (Tadicherla e Berman, 2006). Esta formulação ideal ainda não está disponível, justificando os diversos estudos conduzidos que visam desenvolver uma formulação de anestésico tópico ideal, que fosse também capaz de atingir estruturas profundas com seu efeito sustentado para indicações de dores crônicas, como ocorre em pacientes acometidos com DTMs (Hung et al., 1997; Fisher et al., 1998; Friedman et al., 2001; Koh et al., 2004; Lander et al., 2006; Sawyer et al., 2009).

A pele tem como principal propriedade a proteção dos tecidos subjacentes contra a passagem de substâncias, funcionando como uma barreira contra agressões físicas e químicas externas (Tadicherla e Berman, 2006). Por ser uma barreira, esta não permite que

sustâncias exógenas, com grande tamanho de partícula ou baixa lipossolubilidade, assim como os anestésicos locais, atinjam as terminações nervosas na região subcutânea, rica em vasos, de onde essas substâncias poderiam atingir a corrente sanguínea e serem distribuídas, muito menos nas estruturas profundas como da ATM para exercer sua ação. Para que os AL consigam agir, as composições tópicas devem conter relativamente altas concentrações do anestésico, em comparação as formulações injetáveis, para atingir a mesma potência ou necessitariam de formulações com facilitadores de permeação ou sistemas de liberação, aperfeiçoando a penetração de fármacos através da pele (Peptu et al., 2015).

Com a dificuldade de absorção de algumas substâncias de partícula grande ou baixa lipossolubilidade através da pele, há um grande interesse em se descobrir meios de aumentar a penetração de fármacos e também de cosméticos através da pele (Peptu et al., 2015). Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) representam um recente avanço no melhoramento de formulações para liberação de fármacos, especialmente em aplicação transdérmica. As nanopartículas lipídicas são sistemas veiculares inovadores, sendo biocompatíveis, com baixa toxicidade, boa escalabilidade de produção, modulação de liberação de fármacos, não necessitando de solventes orgânicos no processo de preparação, e um vasto potencial de aplicação (oral, dérmica, intravenosa, etc.) (Puglia e Bonina, 2012).

Adicionalmente, os CLN, mostram vantagens importantes para aplicação cutânea, como liberação controlada e maior facilidade de atingir tecidos específicos, reduzindo os riscos de efeitos adversos associados com administração através de outras vias (Puglia e Bonina, 2012). Eles consistem na adição de um lipídio no estado líquido para formar a mistura de lipídios sólidos e líquidos em temperatura ambiente, que compõem o interior da partícula, essa mistura no estado de suas partículas seria capaz de liberar o fármaco ou composto ativo encapsulado ao longo do tempo. Deste modo, esses carreadores têm maior eficiência de encapsulação e prolongada liberação de moléculas ativas encapsuladas devido a presença do óleo (lipídio líquido na temperatura ambiente) (Saupe et al., 2005).

Hidrogéis são polímeros capazes de absorver grande quantidade de água. Estruturalmente são constituídos por uma (homopolímeros) ou mais redes poliméricas (copolímeros) tridimensionalmente estruturadas, formadas por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes (reticulações) ou interações físicas (Oviedo et al., 2008). Dentre os hidrogéis, destacam-se as formulações termorreversíveis à base de poloxamers (PL). Os PLs são copolímeros formados por unidades de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP), organizadas em estruturas que se arranjam em tri-blocos de EOX –POY –EOX, não tóxicos e capazes de formar gel *in situ*. Dentre os tipos de PL mais estudados podemos

citar o PL407 (PL407), que tem sido amplamente aplicado no desenvolvimento de formulações farmacêuticas de liberação modificada (Dumortier et al., 2006).

Dentro desse contexto, a hipótese deste estudo é que a encapsulação da tetracaína em CLN em formulação de hidrogéis à base de PL407 promova uma liberação sustentada do AL através da pele, podendo assim ser considerada uma formulação promissora para futuros estudos *in vivo*, e futura aplicação no controle de dor crônica de estruturas profundas, como nos casos de pacientes afetados pelas DTMs.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os anestésicos locais são fármacos muito utilizados na Odontologia, por impedirem a sensação dolorosa nos pacientes, tornando o atendimento mais confortável, por isso, são muito estudados quanto às suas formas de aplicação. No entanto, o próprio procedimento de anestésiar o paciente já gera dor e desconforto ao paciente, sendo então lançado mão o uso de anestésicos tópicos, que algumas vezes também não se mostram eficazes no controle de dor durante punção e injeção de anestésicos locais, por isso, há grande interesse em se estudar a anestesia tópica, a qual consiste em aplicar uma formulação tópica, na forma de gel ou pomada, esperando que o mesmo atravesse a barreira biológica da pele ou mucosa (Franz-Montan et al., 2016). Uma formulação tópica anestésica considerada ideal deve promover anestesia em poucos minutos e apresentar duração de ação prolongada (Tadicherla e Berman, 2006).

Para que uma formulação tópica transdérmica seja efetiva, é necessário que ela seja capaz de atravessar a barreira do epitélio orto-queratinizado da pele, e mais abaixo, o estrato granuloso e também a camada basal até chegar na derme, a qual é rica em tecido conjuntivo por onde o anestésico se difundiria para a circulação sanguínea e também seria capaz de atingir as fibras nervosas nociceptoras (Jacobi et al., 2007).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), são nanopartículas lipídicas, que vem se mostrando de grande valia no que diz respeito a liberação de fármacos, especialmente, os hidrofóbicos, além de contribuir para a estabilidade das formulações, favorecendo maior eficiência na permeação de fármacos por essa barreira biológica de forma segura. Esses carreadores, quando associados aos AL, favorecem as propriedades físico-químicas, sua biocompatibilidade, além da liberação sustentada do fármaco e sua eficácia (De Araújo et al., 2019). Uma das vantagens desses carreadores é que eles possuem características únicas, como sua matriz líquida e sólida a temperatura ambiente, que permitem esses materiais serem utilizados em vários tipos de aplicação em medicamentos ou cosméticos. Além disso, devido a sua natureza polimérica, esses materiais oferecem a possibilidade de controlar e modular a estabilidade das partículas, a eficiência de carregamento, cinética de liberação e modificação de superfície (Puglia e Bonina 2012; Wechsler et al., 2019).

As desordens temporomandibulares (DTMs) acometem um grande contingente da população atualmente (Wieckiewicz, 2015). O tratamento das DTMs, no entanto, ainda não é bem definido, podendo se basear na ingestão de fármacos, fisioterapia, sessões de acupuntura e, em alguns casos, até cirurgias. A farmacoterapia com ingestão de

antidepressivos tricíclicos, anti-inflamatórios, corticoides e relaxantes musculares é uma das alternativas de tratamento (Cairns, 2010). A administração de anestésicos locais também poderia ser indicada (Costa et al. 2019), entretanto, a injeção de anestésicos locais pode ser desconfortável para o paciente, então, a administração transdérmica de AL seria interessante por facilitar a adesão dos pacientes e seu conforto. As dificuldades no controle da dor em pacientes acometidos com DTMs fazem com que novos estudos sejam necessários em busca de novas ferramentas e medicamentos para o controle da dor a longo prazo.

Uma das opções terapêuticas disponíveis seria a anestesia tópica da região acometida pelos sintomas das DTMs. Liu et al., 2019 estudou a tetracaína livre, encapsulada em CLN e nanopartículas poliméricas carregadas com tetracaína, e analisou seus efeitos anestésicos. Observou-se que a tetracaína encapsulada em CLN apresentou melhor permeação cutânea em pele de rato sem pelo, tempo de duração da anestesia e controle da intensidade da dor, em ensaio de tail-flick, o que sugere, que este fármaco pode promover anestesia tópica em pele de longa duração.

Costa et al., 2019 compararam o perfil somatossensorial de pacientes saudáveis com pacientes que apresentam qualquer tipo de desordem temporomandibular, quando administrado um creme de lidocaína a 4%. Observou-se, neste estudo, que a lidocaína não causou alteração de sensibilidade somatossensorial nos pacientes com DTMs, o que sugere, que esses pacientes possuem conjuntos de fibras sensitivas distintas de pacientes saudáveis. O estudo concluiu que a anestesia tópica se mostra como uma alternativa mais simples e não invasiva para resolução de dores musculoesqueléticas crônicas. Além disso, estes resultados corroboram a complexidade das alterações dos mecanismos somatossensoriais, dificuldade de diagnóstico e tratamento dessa enfermidade. Assim, estudos clínicos com formulações melhoradas de anestésicos locais, como a encapsulação da tetracaína, são necessários para melhor entendimento e tratamento das DTMs. Neste contexto, nosso trabalho contribui com o desenvolvimento de uma nova formulação com perfil de permeação através da pele interessante, o que poderá contribuir para diminuir ou amenizar os sintomas dolorosos em pacientes acometidos com essas desordens.

A administração de fármacos via oral para o tratamento das DTMs está associada a efeitos adversos, metabolismo de primeira passagem e dificuldade de adesão dos pacientes ao tratamento, desta forma, novas formas farmacêuticas e novos sistemas de liberação de fármacos são promissores no tratamento das DTMs. Wehrfritz e colaboradores (2011) em um ensaio clínico demonstraram que o desenvolvimento de um filme contendo lidocaína a 5% diminui significativamente a sensação dolorosa quando aplicado sobre a pele intacta, e no seu uso prolongado, o filme causou diminuição significativa da densidade de fibras nervosas,

o que seria possivelmente eficaz no tratamento de dores crônicas associadas às DTMs, com redução de efeitos colaterais sistêmicos indesejados.

A avaliação *in vitro* da capacidade de permeação de formulações tópicas em células de difusão vertical do tipo Franz utilizando barreiras biológicas de pele ou mucosas são importantes nas fases iniciais de desenvolvimento de formulações, além disso, estes ensaios são amplamente utilizados por sua relativa facilidade de execução, facilidade de comparação de resultados no desempenho e controle de qualidade no pós-registro de medicamentos (Brasil, 2013).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi avaliar se carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) podem melhorar a capacidade de permeação transdérmica da tetracaína a 4% veiculadas em hidrogéis termorreversíveis à base de poloxamer 407, visando potencial uso futuro desta formulação como terapia pouco invasiva para o controle de dor crônica em pacientes afetados pelas DTMs.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Formulações a serem estudadas

Este estudo foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Eneida de Paula (Instituto de Biologia da UNICAMP) e com sua aluna de mestrado Simone Ramos de Castro, a qual preparou e caracterizou as seguintes formulações a serem testadas no presente estudo:

- Hidrogel à base de poloxamer 407 com tetracaína a 4%: Gel PL 407 + TTC4%
- Hidrogel à base de poloxamer 407 com tetracaína a 4% encapsulada em carreador lipídico nanoestruturado: Gel PL 407 + CLNTTC4%.

4.2 Preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo tetracaína

Os CLN foram preparados através do método de emulsificação-ultrassom (Das et al., 2012; Mendes et al., 2013). Brevemente, a fase oleosa foi preparada pela adição dos lipídios sólidos e líquidos, em conjunto, num béquer de vidro; em seguida eles foram aquecidos em banho-maria, em temperatura 5-10°C acima do ponto de fusão do lipídio sólido (MM = 34°C), sob agitação contínua a fim de se conseguir uma mistura homogênea. Logo após, uma quantidade de fármaco 4% (TTC base) foi adicionado à mistura de lipídios fundidos e a amostra mantida sobre agitação até completa dissolução. Ao mesmo tempo, num recipiente separado, a fase aquosa foi preparada por dissolução do surfactante (Pluronic F68) em água desionizada aquecida à mesma temperatura da fase lipídica. Em seguida, a fase aquosa foi adicionada à fase lipídica e homogeneizada, sob agitação, a alta velocidade em Ultra-Turrax® T18 (IKA® T18 basic), à 10000 rpm, por 3 min (Figura 1). A pré-emulsão O/A obtida foi mantida sob aquecimento e sonicada, usando-se um sonicador de sonda (Vibracell, Sonics e Materials Inc.), potência de 50w, 20 kHz, durante 30 min., com 30 ciclos de 30s (ligado/desligado). Nesta etapa foi formada uma nanoemulsão O/A, que foi imediatamente transferida para frascos e colocada em banho de gelo para arrefecer rapidamente até a temperatura de 25°C e originar as dispersões de nanopartículas. Ao final das preparações, todas as amostras (CLN) foram armazenadas em frascos e mantidas a temperatura ambiente, para posterior incorporação nos hidrogéis.



Figura 1 - Preparação das NLC utilizando homogeneizador de alta pressão (Ultra-Turrax®).

4.3 Preparo das formulações de hidrogéis de poloxamer 407.

Brevemente, o hidrogel à base de poloxamer 407 com tetracaína a 4% foi preparado através da dispersão direta do fármaco em solução de poloxamer 407 (Pluronic® F-127, Sigma-Aldrich®) à 25% (p/v), mantidas a 4°C, sob agitação (300 rpm) por pelo menos 2 horas (Schmolka, 1972).

Para obter os hidrogéis contendo TTC a 4% em CLN, 25mL da solução de PL407 contendo TTC a 4% foi dispersa diretamente em 25 mL da formulação de CLN-TTC 4% previamente preparada (de acordo com o item 4.2).

4.4 Metodologia analítica para quantificação de tetracaína por cromatografia de líquida de alta eficiência (CLAE).

O AL TTC foi quantificado por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). As condições cromatográficas para quantificação da tetracaína foram:

Fase Móvel: Fosfato de Amônia (10 mM) pH 3,0 / Acetonitrila (70:30)

Volume de Injeção: 30 µL

Fluxo: 1,5 mL/min

Detector: UV 280nm

Coluna: 250x4,6nm Luna® C18

4.5 Preparo da pele para os ensaios de permeação

Para a realização dos ensaios de permeação em pele, orelhas de porco foram obtidas de abatedouro devidamente certificado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (Frigorífico Angelelli Ltda.) logo após o abate dos animais e transportados em tampão fosfato (pH 7,4) (Figura 2). Ao chegar no laboratório, as orelhas foram lavadas com/ água destilada e os pelos visíveis foram removidos cuidadosamente com uma tesoura (Figura 3) (Herkenne et al., 2006). Posteriormente, elas foram dermatomizadas (Figura 4) (Dermatome Nouvag, AG, Goldach, Suíça) a uma espessura padronizada de aproximadamente 500 μm , separadas em dimensões padronizadas (~ 4 cm^2) e imersas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) para lavagem e secas em um filtro de papel e congeladas a -20°C até o uso. (Figura 5). O tempo máximo de armazenagem da pele utilizada no estudo foi de 6 meses.

Ao chegar no laboratório, as orelhas foram lavadas com água destilada e os pelos visíveis foram removidos cuidadosamente com uma tesoura (Figura 3) (Herkenne et al., 2006). Posteriormente, elas foram dermatomizadas (Figura 4) (Dermatome Nouvag, AG, Goldach, Suíça) a uma espessura padronizada de aproximadamente 500 μm , separadas em dimensões padronizadas (~ 4 cm^2) e imersas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) para lavagem e secas em um filtro de papel e congeladas a -20°C até o uso. (Figura 5). O tempo máximo de armazenagem da pele utilizada no estudo foi de 6 meses.

Antes do experimento, a pele foi retirada do freezer e mantida em temperatura ambiente por 20 min para completo descongelamento. Antes da realização dos ensaios de permeação, a pele foi montada na célula vertical de difusão tipo Franz e inicialmente avaliada quanto à sua integridade através da medida de resistividade, a qual deveria ser de $\geq 50 \text{ K}\Omega/\text{cm}^2$. Eletrodos de Ag/AgCl foram posicionados nos compartimentos doador e receptor, em contato com um gerador de sinal Keysight 33220A (Agilent®), e um multímetro digital ET-2053DMM (Minipa®), respectivamente. Os tecidos que não atingiram o valor mínimo preditor de integridade foram descartados e não seguiram para o ensaio de permeação (Kasting e Bowman, 1990).



Figura 2 - Orelhas de porco armazenadas em Tampão fosfato (pH 7,4)



Figura 3 - Pelos visíveis sendo removidos das orelhas



Figura 4 - Dermatomização das orelhas



Figura 5 - Secagem das peles em papel filtro, para posterior armazenamento

4.6 Ensaio de solubilidade do AL – determinação da solução receptora nos ensaios de permeação

Antes da realização dos ensaios de permeação, foi necessário determinar a solubilidade do AL utilizado para garantir as condições *sink* durante o experimento, isto é, a máxima concentração do fármaco no compartimento receptor não poderia exceder 10% da solubilidade do anestésico local. A tetracaína teve sua solubilidade avaliada em solução do tampão PBS (pH 7,4), contendo 5% de *Tween*® 80.

Para se definir a solubilidade da tetracaína foi utilizada uma mesa agitadora contendo frascos com micro agitadores magnéticos a 300 rpm, e com soluções de 5mL de solução PBS + 5% de *Tween*® 80 acrescentado pó do fármaco, em cada frasco, os quais foram agitados até sua saturação. Esses frascos permaneceram sob agitação constante e temperatura estável durante 24 horas. Após esse período, centrifugou-se as soluções por 20 minutos em velocidade de 10.000 rpm, e estas foram filtradas com filtro de seringa. Em seguida a solução foi diluída e quantificada por CLAE, de acordo com o método descrito e validado.

4.7 Ensaio de permeação *in vitro* das formulações através de pele de orelha de porco em célula de difusão vertical tipo Franz

O experimento de permeação com as formulações através da pele de orelha de porco foi realizado na célula de difusão vertical tipo *Franz* com área de permeação de 1,77 cm² (Sistema Transdérmico Manual, Hanson Research Corporation, CA, USA) (Figura 6). A pele dermatomizada (~500 µm) foi posicionada com o lado do estrato córneo voltado para o compartimento doador, entre os compartimentos doador e o receptor. O compartimento doador foi preenchido com cerca de 300 mg de cada formulação caracterizando situação de dose infinita. A condição *sink* foi mantida durante o experimento. Esta condição significa que a concentração máxima do fármaco no compartimento receptor é 10 vezes menor que a sua solubilidade naquele solvente.

Os ensaios de permeação foram realizados na mesa de permeação (Figura 7), durante um período de 8 horas, à temperatura controlada de 32 °C e sob agitação constante (300 rpm). Em intervalos pré-estabelecidos (de T0 até T3 os intervalos foram de 30 minutos, a partir de T4 os intervalos passaram a ser de 1 hora até T10), foram retiradas alíquotas da solução receptora (300 µL), que em seguida foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Ao compartimento receptor, foram adicionados volumes idênticos aos retirados os quais foram utilizados para o cálculo da diluição realizada. Os experimentos foram realizados no mínimo em sextuplicatas (n=6, para cada uma das formulações).

O perfil de permeação foi determinado a partir da média da quantidade cumulativas de tetracaína permeada por cm² em função do tempo. Para o cálculo dos parâmetros de permeação fluxo (J_{ss}) e tempo de latência (*lag time*), foi construído um gráfico para cada célula, a partir da quantidade de tetracaína acumulada no compartimento receptor por cm² *versus* tempo (intervalos de tempo de cada coleta). A inclinação da porção linear dos gráficos representou o fluxo (J_{ss}) de penetração da tetracaína através da pele e a sua intersecção com o eixo das abscissas permitiu determinar o valor do tempo de latência (*lag time*).



Figura 6 - Célula vertical tipo Franz. Fonte: <https://hansonresearch.com/diffusion-testing/manual-diffusion/>



Figura 7 – Vista superior da mesa de permeação

5 RESULTADOS

5.1 Validação da metodologia analítica e teor

A validação da metodologia analítica foi realizada a fim de permitir a quantificação de tetracaína nos hidrogéis (testes de teor), ensaio de solubilidade e permeações. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação, certificando assim a confiabilidade dos resultados. O método apresentou-se adequado para análise do AL sendo todos os resultados obtidos dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para as concentrações analisadas com linearidade (r^2) acima de 0,999 para tetracaína; exatidão na faixa de 98 a 102%, precisão na faixa de 0,3 a 2,64, limites de detecção e quantificação de 0,318 $\mu\text{g/mL}$ e 1,078 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, estando dentro das especificações estabelecidas (Brasil, 2013; Brasil, 2003).

Após a validação foram realizados testes de teor, e os resultados obtidos foram de 4,71 mg/mL para o Gel PL 407 + TTC4%, e 5,36 mg/mL para o Gel PL 407 + CLNTTC4%.

5.2 Ensaio de permeação através de pele de orelha de porco

A figura 8 mostra o perfil de permeação do anestésico local Tetracaína através da pele de orelha de porco. A tabela 1 mostra os parâmetros de permeação calculados (fluxo e *lag time*).

A formulação de tetracaína encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados apresentou menor fluxo (teste t não pareado; $p < 0,05$) quando comparado com a formulação livre. As formulações não diferiram quanto ao *lag time* (teste t não pareado; $p > 0,05$).

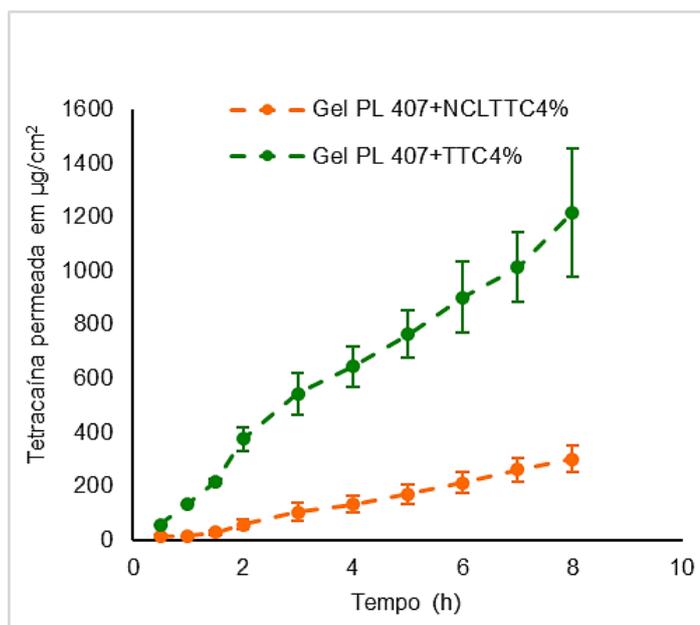


Figura 8 - Perfil de permeação da Tetracaína.

Tabela 1 - Parâmetros de permeação de tetracaína encapsulada ou não em carreador lipídico nanoestruturado: fluxo e *lag time*.

	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)	<i>Lag time</i> (h)
PL407+NCLTTC4%	$177,97 \pm 49,76^*$	$3,61 \pm 0,13$
PL407+TCC4%	$223,89 \pm 27,37$	$3,40 \pm 0,95$

6 DISCUSSÃO

Foi utilizada pele de orelha de porco, por apresentar semelhança estrutural com a pele dos seres humanos, e além disso, ter grande disponibilidade do tecido na indústria alimentícia, assim sendo, não é necessária a aprovação do comitê de ética. Segundo Jacobi et al., 2007, o tecido cutâneo de suínos apresenta semelhanças estruturais com o tecido cutâneo humano quanto a penetração de substâncias aplicadas topicamente, principalmente as hidrofílicas.

O presente estudo confirmou a hipótese de que a encapsulação da tetracaína pode promover uma liberação sustentada do AL através da pele, podendo promover uma ação duradoura e ser considerada promissora para ser testada *in vivo* visando seu futuro uso como alternativa pouco invasiva para o controle da dor crônica em pacientes acometidos por DTM. A característica de liberação sustentada observada no presente estudo pode resultar em maior capacidade de permanecer nas camadas da pele por mais tempo, aumentando assim a duração de ação do anestésico local. Resultados semelhantes foram observados por Babaei et al., 2016 no qual a lidocaína nesse mesmo sistema carreador foi capaz de ficar depositado nas camadas da pele por mais tempo. O perfil sustentado de permeação da tetracaína poderia ser explicado pela sua interação com a matriz lipídica líquida e sólida dos CLNs, que faz com que o fármaco encapsulado seja lentamente liberado, assim os CLNs funcionariam como uma espécie de reservatório do fármaco que seria liberado ao longo do tempo (Puglia e Bonina, 2011).

De forma similar, Puglia e Bonina (2011) também demonstraram que os anestésicos benzocaína e lidocaína quando incorporados aos carreadores lipídicos nanoestruturados apresentaram menor fluxo quando comparado com os anestésicos livres. Além disso, eles demonstraram em estudo *in vitro* de modelos de permeação em pele humana que os anestésicos tiveram perfil de liberação sustentado e que o CLN são bons carreadores e podem funcionar como um reservatório para os anestésicos, conseqüentemente prolongando o efeito anestésico. Além disso, em um modelo animal de eficácia (*tail flick*) para avaliação da eficácia anestésica, as formulações encapsuladas promoveram anestesia com maior duração com mais longa antinocicepção, indicando uma liberação prolongada na associação com CLN.

Desta forma, a associação entre os carreadores lipídicos nanoestruturados e os anestésicos locais promove permeação lenta desses fármacos em aplicação transdérmica, indicando um possível efeitos clínicos sustentado dessas formulações, que seria interessante no tratamento das DTMs, assim o anestésico tópico poderia reduzir a nocicepção e a dor

associada as DTMs sem a necessidade de procedimentos desconfortáveis como a injeção de anestésicos locais ou a possibilidade de efeitos colaterais desagradáveis associado a terapêutica farmacológica convencional.

Entretanto, ainda será necessário elucidar a possibilidade da utilização dos anestésicos tópicos no tratamento de DTMs de forma contínua. Durante um ensaio clínico randomizado, houve experimentação clínica de formulação de anestésicos tópicos e quando se analisou a lidocaína a 4% livre, observou-se que não houve diminuição da sensação dolorosa em pacientes com desordens temporomandibulares através do relato de dor (Costa et al., 2019), por isso, o estudo da tetracaína encapsulada é interessante, já que ela apresentou um perfil de permeação sustentado, sugerindo que a mesma teria um bom comportamento promovendo efeito anestésico por tempo prolongado. Portanto, a busca por melhorias nas formulações tópicas com sistemas de liberação controlada poderá demonstrar vantagens comparado com as formulações comerciais com os anestésicos livres, vindo a ser no futuro, um prática terapêutica promissora no alívio da dor associada a DTMs.

Normalmente, os métodos farmacológicos tradicionais de tratamento das DTMs geralmente utilizam fármacos administrados por via oral, algumas desvantagens são encontradas durante este tratamento, como demora para início de ação do fármaco, possíveis efeitos colaterais sistêmicos, e dificuldade de deglutição e de adesão do paciente, então fármacos administrados por vias alternativas, como a via transdérmica, seriam promissores com a diminuição desses inconvenientes ou efeitos colaterais sistêmicos indesejáveis (Ta e Dione, 2004). A aplicação cutânea de filmes anestésicos em pacientes vem se mostrado como uma estratégia interessante de anestesia tópica (Wehrfritz et al., 2011) assim como seria a aplicação tópica de um gel anestésico com suas propriedades de permeação melhoradas.

Desta forma, estudos futuros se fazem necessários na busca do desenvolvimento e teste de novas formulações a serem empregadas no tratamento das DTMs, melhorando a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Além disso, o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados ou outros carreadores poderá melhorar permeação de fármacos indicados no tratamento das DTMs, assim como os CLNs associados com AL, o que proporcionou permeação controlada do agente anestésico, o que seria interessante para atingir a articulação temporomandibular e promover bloqueia nocicepção em casos de DTM com efeito anestésico prolongado.

Nesse contexto, o melhoramento de formulações anestésicas tópicas vem sendo avaliado. Recentemente a permeação *in vitro* de tetracaína encapsulada em CLN através de pele de ratos, e o efeito antinociceptivo avaliado por teste de tail-flick foram avaliados. Os

autores demonstraram que a permeação da tetracaína foi menor quando comparado ao fármaco livre, o que corrobora com nosso estudo. Curiosamente, também se observou melhor e mais prolongado efeito antinociceptivo em ratos. Esses resultados indicam a viabilidade de desenvolvimento de uma formulação anestésica tópica associada com carreadores lipídicos nanoestruturados capaz de proporcionar liberação sustentada do anestésico aumentando o tempo de anestesia (Liu et al. 2019). Esses resultados abrem perspectivas para novos estudos de eficácia in vivo para avaliar o potencial efeito analgésico desta formulação no controle de dor decorrente de DTMs.

7 CONCLUSÃO

Hidrogel contendo tetracaína em carreadores lipídicos nanoestruturados apresentou perfil sustentado de permeação o que poderia indicar maior retenção do fármaco em seu sítio de aplicação, resultando em efeito prolongado e eficaz no controle de dor em pacientes acometidos com DTMs.

REFERÊNCIAS*

Babaei S, Ghanbarzadeh S, Adib ZM, Kouhsoltani M, Davaran S, Hamishehkar H. Enhanced skin penetration of lidocaine through encapsulation into nanoethosomes and nanostructured lipid carriers: a comparative study. *Pharmazie*. 2016 May;71(5):247-51. 27348967;

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 48, de 25 de Outubro de 2013. Pós-registro de medicamentos.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de Maio de 2003 [acesso 2019 Ago 12]. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b.

Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain--basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *J Oral Rehabil*. 2010 May;37(6):391-410. doi: 10.1111/j.1365-2842.2010.02074.x.

Costa YM, Ferreira DMAO, Conti PCR, Baad-Hansen L, Svensson P, Bonjardim LR. Topical anesthesia degree is reduced in temporomandibular disorders patients: a novel approach to assess underlying mechanisms of the somatosensory alterations. *J Oral Rehabil*. 2019 Aug 16. doi: 10.1111/joor.12874.

De Andrade, ED. Et al. *Terapêutica medicamentosa em Odontologia*. 2014. 3 ed. Editora Artes Médicas LTDA.

De Araujo DR, Ribeiro LNM, De Paula E. Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics, *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2019 Sep 16. DOI:10.1080/17425247.2019.1629415.

Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*. 2006 Dec;23(12):2709-28.

Fisher R, Hung O, Mezei M, Stewart R. Topical anaesthesia of intact skin: liposome-encapsulated tetracaine vs EMLA. *Br J Anaesth*. 1998 Dec;81(6):972-3.

Franz-Montan M, Ribeiro LNM, Volpato MC, Cereda CMS, Groppo FC, Tofoli GR, de Araújo DR, Santi P, Padula C, de Paula E. Recent advances and perspectives in topical oral anesthesia. *Expert Opin Drug Delivery*. 2017 May 14. doi:10.1080/17425247.2016.1227784

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Friedman PM, Mafong EA, Friedman ES, Geronemus RG. Topical anesthetics update: EMLA and beyond. *Dermatol Surg*. 2001 Dec;27(12):1019-26.

Graff-Radford SB, Bassiur JP. Temporomandibular disorders and headaches. *Neurol Clin*. 2014 May;32(2):525-37. doi: 10.1016/j.ncl.2013.11.009. Epub 2014 Feb 28.

Hung OR, Comeau L, Riley MR, Tan S, Whynot S, Mezei M. Comparative topical anaesthesia of EMLA and liposome-encapsulated tetracaine. *Can J Anaesth*. 1997 Jul;44(7):707-11.

Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, Sterry W, Lademann J. Porcine ear skin: an *in vitro* model for human skin. *Skin Res Technol*. 2007 Feb;13(1):19-24.

Kasting GB, Bowman LA. DC electrical properties of frozen, excised human skin. *Pharm Res*. 1990 Feb;7(2):134-43.

Koh JL, Harrison D, Myers R, Dembinski R, Turner H, McGraw T. A randomized, double-blind comparison study of EMLA and ELA-Max for topical anesthesia in children undergoing intravenous insertion. *Paediatr Anaesth*. 2004 Dec;14(12):977-82.

Lander JA, Weltman BJ, So SS. EMLA and amethocaine for reduction of children's pain associated with needle insertion. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jul 19;(3):CD004236. Review. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;3:CD004236.

Liu X, Zhao Q. Long-term anesthetic analgesic effects: Comparison of tetracaine loaded polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles, and nanostructured lipid carriers *in vitro* and *in vivo*. *Biomed Pharmacother*. 2019 Sep;117:109057. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109057.

Madeira MG, Rizzolo RJC. *Anatomia facial com fundamentos de anatomia geral*. 2015. 5 ed. Editora Sarvier.

Mendes AI, Silva AC, Catita JA, Cerqueira F, Gabriel C, Lopes CM. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 Nov 1;111:755-63. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.05.041.

Nascimento MMM, Porto GG, Nogueira CM, Vasconcelos BCE. Anesthetic blockage of the auriculotemporal nerve and its clinical implications. *Odonto Clín Cient*. 2011 Jun 10(2):143-146.

Oviedo I R, Méndez N A N, Gómez M P G, Rodriguez H C, Matínez AR. Design of a Physical and Nontoxic Crosslinked Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel. 2008. *Int J Polym Mater.* 57:12, 1095-1103, DOI: 10.1080/00914030802341661

Peptu C, Rotaru R, Ignat L, Humelnicu AC, Harabagiu V, Peptu CA, Leon MM, Mitu F, Cojocar E, Boca A, Tamba BI. Nanotechnology approaches for pain therapy through transdermal drug delivery. *Curr Pharm Des.* 2015;21(42):6125-39.

Puglia C, Bonina F. Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. *Expert Opin Drug Deliv.* 2012 Apr;9(4):429-41. doi: 10.1517/17425247.2012.666967.

Puglia C, Sarpietro MG, Bonina F, Castelli F, Zammataro M, Chiechio S. Development, characterization, and *in vitro* and *in vivo* evaluation of benzocaine- and lidocaine-loaded nanostructured lipid carriers. *J Pharm Sci.* 2011 May;100(5):1892-9. doi: 10.1002/jps.22416.

Saupe A, Wissing SA, Lenk A, Schmidt C, Müller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) -- structural investigations on two different carrier systems. *Biomed Mater Eng.* 2005;15(5):393-402.

Sawyer J, Febbraro S, Masud S, Ashburn MA, Campbell JC. Heated lidocaine/tetracaine patch (Synera, Rapydan) compared with lidocaine/prilocaine cream (EMLA) for topical anaesthesia before vascular access. *Br J Anaesth.* 2009 Feb;102(2):210-5. doi: 10.1093/bja/aen364.

Schmolka IR. Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res.* 1972 Nov;6(6):571-82.

Scrivani SJ, Keith DA, Kaban LB. Temporomandibular disorders. *N Engl J Med.* 2008 Dec 18;359(25):2693-705. doi: 10.1056/NEJMra0802472.

Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization. *J Microencapsul.* 1999 Mar-Apr;16(2):205-13.

Ta LE, Dionne RA. Treatment of painful temporomandibular joints with a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized placebo-controlled comparison of celecoxib to naproxen. *Pain.* 2004 Sep;111(1-2):13-21. PubMed PMID: 15327804.

Tadicherla S, Berman B. Percutaneous dermal drug delivery for local pain control. *Ther Clin Risk Manag.* 2006 Mar;2(1):99-113.

Wang Y, Wang S, Shi P. Transcriptional transactivator peptide modified lidocaine-loaded nanoparticulate drug delivery system for topical anesthetic therapy. *Drug Deliv.* 2016 Nov;23(9):3193-3199.

Wechsler ME, Ramirez Julia EV, Peppas NA. Nanoparticle Mediated Drug Delivery for the Treatment of Alzheimer's Disease: Crossing the Blood–Brain Barrier. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2019, 58, 15079–15087

Wehrfritz A, Namer B, Ihmsen H, Mueller C, Filitz J, Koppert W, Leffler A. Differential effects on sensory functions and measures of epidermal nerve fiber density after application of a lidocaine patch (5%) on healthy human skin. *Eur J Pain.* 2011 Oct;15(9):907-12. doi: 0.1016/j.ejpain.2011.03.011.

Wieckiewicz M, Boening K, Wiland P, Shiau YY, Paradowska-Stolarz A. Reported concepts for the treatment modalities and pain management of temporomandibular disorders. *J Headache Pain.* 2015 Dec 7. Review. doi: 10.1186/s10194-015-0586-5.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO DE TETRACAÍNA ENCAPSULADA EM CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS EM HIDROGÉIS TERMORREVERSÍVEIS ATRAVÉS DA PELE

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

4%	4%	2%	2%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS
FONTES PRIMÁRIAS			
1	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno		1%
2	www.usf.edu.br Fonte da Internet		1%
3	repositorio.ufpe.br Fonte da Internet		1%
4	pct.capes.gov.br Fonte da Internet		1%
5	repositorio.ufscar.br Fonte da Internet		1%

Anexo 2 – Iniciação Científica

PIBIC - Área Aluno [quota: 2016]

☆ Início
≡ Alterar quota
📄 Termo de Compromisso <
📄 Relatório ▾
Parcial
Final
👤 Alterar Dados
🔑 Alterar Senha
🚪 Sair

Relatório Final

Período de envio do Relatório Final: 01/08/2017 - 14/08/2017

Versão enviada em 14/08/2017 18:14:45 [ver relatório](#)

- Parecer do orientador emitido em 16/08/2017 08:40:43
- Parecer do Assessor dado em 27/11/2017 15:16:09
(O parecer a respeito de seu relatório está disponível ao orientador responsável)
- **Aprovado**