



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA**

**ARTICAÍNA: TOXICOMETABOLÔMICA E DESENVOLVIMENTO DE  
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA AUMENTO DA POTÊNCIA  
ANESTÉSICA EM TECIDOS INFLAMADOS**

**ARTICAINE: TOXICOMETABOLOMICS AND DEVELOPMENT OF  
LIPID NANOPARTICLES TO IMPROVE ANESTHESIA AT INFLAMED  
TISSUES**

CAMPINAS  
2022

GUSTAVO HENRIQUE RODRIGUES DA SILVA

**ARTICAÍNA: TOXICOMETABOLÔMICA E DESENVOLVIMENTO DE  
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA AUMENTO DA POTÊNCIA  
ANESTÉSICA EM TECIDOS INFLAMADOS**

**ARTICAINE: TOXICOMETABOLOMICS AND DEVELOPMENT OF  
LIPID NANOPARTICLES TO IMPROVE ANESTHESIA AT INFLAMED  
TISSUES**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica no âmbito do Acordo de Cotutela firmado entre a Unicamp e a Universidade de Aveiro, Portugal.

Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Functional and Molecular Biology, in the Biochemistry area, under the joint supervision Agreement signed between University of Campinas and University of Aveiro, Portugal.

**Orientadoras:** Profa Dra. Eneida de Paula (Brasil)

Dra. Iola M. F. Duarte (Portugal)

**Coorientadora:** Dra. Lígia N. M. Ribeiro (Brasil)

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO  
GUSTAVO H. R. DA SILVA E ORIENTADA PELA  
PROFA DRA. ENEIDA DE PAULA

CAMPINAS  
2022

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R618a Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique, 1981-  
Articaína : toxicometabolômica e desenvolvimento de nanopartículas  
lipídicas para aumento da potência anestésica em tecidos inflamados /  
Gustavo Henrique Rodrigues da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientadores: Eneida de Paula e Iola Messias Fernandes Duarte.  
Coorientador: Lígia Nunes de Moraes Ribeiro.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de  
Biologia.  
Em cotutela com: Universidade de Aveiro.

1 Anestésicos locais. 2. Metabolômica. 3. Carregadores lipídicos  
nanoestruturados. I. Paula, Eneida de, 1963-. II. Duarte, Iola Messias  
Fernandes. III. Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes, 1986-. IV. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Articaine : toxicometabolomics and development of lipid  
nanoparticles to improve anesthesia at inflamed tissues

**Palavras-chave em Inglês:**

Local anesthetics

Metabolomics

Nanostructured lipidic carriers

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Eneida de Paula [Orientador]

Iola Messias Fernandes Duarte

Eliana Martins Lima

Thelma de Aguiar Pertinhez

Diego Stéfani Teodoro Martinez

Michelle Franz Montan Braga Leite

**Data da defesa:** 30-08-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7377-8532>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8790451684029708>

Campinas, 30 de agosto de 2022.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

1. Dra. Eneida de Paula (orientadora no Brasil)
2. Dra. Iola M. Fernandes Duarte (orientadora no Exterior) - Universidade de Aveiro-Portugal
3. Dra. Eliana Martins Lima - Universidade Federal de Goiás/Goiânia
4. Dra. Thelma de Aguiar Pertinhez - Università degli Studi di Parma - Itália
5. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martins – Laboratório Nacional de Nanotecnologia
6. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite - FOP/UNICAMP

*A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp.*

**À minha família**

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Profa. Eneida, a quem, sinceramente, não tenho palavras para expressar minha gratidão. Sou agradecido “por ter nascido para a ciência” através de suas mãos. Uma orientadora cativante, que me conduziu ao crescimento, que me encanta com seu conteúdo, com seu amor e dedicação pelo ensino e pesquisa, pela forma de ensinar, de escrever, etc... Espero um dia conseguir ser um pouco de tudo que és.

À Dra. Iola, orientadora na Universidade de Aveiro em Portugal, que foi tão solícita em me receber desde o primeiro e-mail. Apesar do pouco tempo que estive na UA (e da pandemia, que passei em Portugal), consegui entrar no mundo da metabolômica e tenho aprendido a cada conversa que temos. Espero também um dia chegar ao nível de excelência dos seus trabalhos.

À minha família! Também, não há palavras que expressem todo apoio que tenho de vocês. Foram tantos acontecimentos durante esses anos, principalmente a chegada do pequeno Miguel. Quantas alegrias na nossa vida!

Aos meus queridos amigos Mara, Lara, Mônica, Rena, Juliana, Danilo e Cristiane, Douglas e Laila, vocês são um refúgio e trouxeram alegrias, esperanças e descansos durante esse período.

Aos queridos “irmãos na ciência” do laboratório de Biomembranas: Vivi, Ju, Lud, Ferdinando, Thiago, Verônica, Juan, Hery, Lígia, Simone, Alessandro, Priscila, Maria Fernanda e as caçulinhas queridas Fabíola, Talita e Gabi (em especial, porque com você descobri um gosto para ensinar).

Além desses, este trabalho tem uma perspectiva que aprendi - com Eneida - que é uma das chaves para o desenvolvimento da ciência: foi realizado contando com ajuda de vários diferentes especialistas. Assim, agradeço à Dra. Júlia Leme (pela sua dedicação e aprendizados) e ao Professor Carlos A. Parada; à Dra. Carmen Feijóo e ao Dr. Juan P. García-López que tornaram possível minha ida ao Chile e pelos aprendizados no modelo de Zebrafish. À Dra. Juliana Ruas e Dr. Roger Castilho, pelos experimentos utilizando Seahorse. Ao MSc Helon Cordeiro e à Profa. Carmen V. F. Halder pelos testes de Western Blotting. À querida Profa Márcia C. Breitz, que tanto me ensina na área de quimiometria. Por fim, quero agradecer à Dra Teresa Dalla Costa, da UFRGS, que me recebeu e tem me ensinado sobre a técnica de microdiálise.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado (2017/15174-5) e pela bolsa de pesquisa no exterior (2018/24814-0). Além disso, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa nos meses iniciais deste doutorado e à DFL indústria farmacêutica pela doação da articaína utilizada nesta tese.

DEUS é bom!

## RESUMO

A articaína (ATC) é um anestésico local (AL) relativamente novo no mercado e, apesar disso, é o segundo mais utilizado na clínica odontológica. Uma vantagem de seu uso provém de peculiaridades químicas pois, mesmo pertencendo à família das amino-amidas, possui um anel tiofeno e um grupamento éster que permite sua utilização em maior concentração clínica. Apesar de todos os AL apresentarem neurotoxicidade, há relatos de maior taxa de parestesia associado ao uso de ATC, sem evidências do mecanismo que comprova maior neurotoxicidade da ATC em relação aos outros AL. Além disso, outro problema relacionado a anestesia odontológica é a falha anestésica ou um menor grau de analgesia que pode ocorrer em locais com processos inflamatórios instalados. Neste caso, o tratamento clínico se torna extremamente doloroso, estressante e sem alternativas para o controle eficaz da dor. Diante destas duas limitações relacionados ao uso do AL, o foco desta tese foi a utilização de toxicometabolômica para aprofundar os conhecimentos sobre a neurotoxicidade da ATC, comparativamente à lidocaína (Parte 1) e o desenvolvimento de formulações de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) para a liberação sustentada de ATC, visando aumentar sua potência anestésica em tecidos inflamados (Parte 2).

Parte 1: Nesta primeira etapa utilizamos metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) para estudar a toxicidade da ATC em relação à lidocaína (LDC, “padrão ouro” em odontologia) através das alterações metabólicas ocasionadas em células neuronais. Apesar da literatura indicar que não há diferenças entre ATC e outros AL em relação à toxicidade *in vitro*, a análise metabolômica em células de Schwann (CS) mostrou que a ATC produz alterações metabólicas diferentes em relação a LDC. Especificamente em CS, descobriu-se que a ATC estimula a glicólise e induz aumento nos níveis intracelulares de vários aminoácidos (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, metionina, histidina, tirosina e glicina) cuja concentração diminuiu nas células tratadas com LDC. Além disso, a expressão de proteínas de estresse de retículo e de apoptose foram encontradas nas células tratadas com ATC. Assim, o estudo *in vitro* da metabolômica identificou respostas metabólicas diferenciais que nos permitem questionar se sua toxicidade da ATC é a mesma que a de aos outros AL.

Parte 2: Nesta parte, utilizou-se de forma associada o planejamento experimental (DoE) e modelo de peixe-zebra para selecionar o melhor excipiente funcional, óleo de copaíba (OC) e uma formulação otimizada de NLC-ATC. A formulação otimizada foi caracterizada por DSC, DRX e MET e *in vivo*, no modelo de dor inflamatória induzida por carragenina, promoveu aumento (50%) da atividade anestésica e prolongamento da ação, em comparação com ATC livre, com a ação sinérgica (entre OC e ATC) no controle da dor inflamatória. Além disso, os resultados de farmacocinética, utilizando microdiálise *in situ*, identificaram que o maior efeito anestésico decorre da liberação prolongada do AL pela NLC-ATC no tecido inflamado, evitando sua remoção sistêmica acelerada, em resposta ao processo inflamatório. Assim, a formulação NLC-ATC (funcionalizada e otimizada) apresentou resultados promissores contra a falha anestésica em tecido inflamado, constituindo possível opção inovadora para o mercado odontológico.

**Descritores:** Articaína, toxicometabolômica, carreadores lipídicos nanoestruturados, falha anestésica.

## ABSTRACT

Articaine (ATC) is one of the newest local anesthetics (LA) released in the market, although it is already the second most used LA in the dental clinic. While belonging to the amino-amide class of LA, it has peculiarities such as a thiophene ring and an ester group, which allows its use at higher clinical concentration. Although neurotoxicity has been observed with all LA agents, there are reports of a higher rate of paresthesia associated with the use of ATC. However, the reason for this is not clear and there is no concise literature about the greater neurotoxicity of ATC compared to other LA. In addition, another problem related to dental anesthesia is anesthetic failure, or a lower degree of analgesia, that can occur in places with an inflammatory process. In this case, the clinical treatment becomes extremely painful, stressful and without alternatives for effective pain control. Given these two drawbacks related to LA therapeutics LA, the focus of this work was the use of toxicometabolomics to deepen the knowledge about ATC neurotoxicity - in comparison to lidocaine (LDC) (Part 1) and the development of formulations of nanostructured lipid carriers (NLC) for the sustained release of ATC, aiming at increasing its anesthetic potency in inflamed tissues (Part 2).

Part 1: In this part, we used Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) metabolomics to study the biological effects of ATC in relation to LDC (LDC, “gold standard”) through the detection of metabolic changes caused in neuronal cells. Although the literature reports of no differences between ATC and other LA in relation to *in vitro* toxicity, metabolomics analysis in Schwann cells (SC) showed that ATC produced different metabolic changes in relation to LDC. Specifically, ATC was found to stimulate glycolysis and to increase the intracellular levels of several amino acids (leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, methionine, histidine, tyrosine, and glycine), whereas the concentration of these amino acids decreased in lidocaine-treated SC. ATC also induced greater changes in the rate of cellular oxygen consumption compared to LDC. Besides, the expression of specific proteins indicated the presence of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in ATC-treated cells. Thus, the *in vitro* metabolomics study on ATC identified differential metabolic responses which allow us to question whether its toxicity is the same in relation to other LA.

Part 2: In this part, Design of Experiments (DoE) and zebrafish model were used to select the best functional excipient, copaiba oil (CO), and to obtain an optimized formulation of NLC-ATC. Afterwards, optimized NLC-ATC were characterized by DSC, XRD and MET. *In vivo*, in the carrageenan-induced inflammatory pain model, NLC-ATC showed an increase (50%) in the anesthetic activity and a prolonged action time compared to free (non-encapsulated) ATC, with a synergistic activity between ATC and CO being observed on inflammatory pain control. In addition, using local tissue microdialysis, pharmacokinetic analyses revealed that the observed increase in anesthetic effect is due to the ability of NLC-ATC to prolong the delivery of ATC in the inflamed tissue, preventing its accelerated systemic removal by the inflammatory process. Thus, the functionalized NLC-ATC formulation developed showed promising results in relation to anesthetic failure in inflamed tissue, with an innovative perspective for the dental market.

**Keywords:** Articaine, toxicometabolomics, nanostructured lipid carriers, anesthetic failure.

## SUMÁRIO

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. INTRODUÇÃO .....                                                                       | 11 |
| 1. Anestésicos locais .....                                                               | 11 |
| 2. Falha anestésica.....                                                                  | 13 |
| 3. Articaína.....                                                                         | 13 |
| II. OBJETIVO .....                                                                        | 16 |
| 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                            | 16 |
| 1.1 Parte 1.....                                                                          | 16 |
| 1.2 Parte 2.....                                                                          | 16 |
| III. PARTE 1 .....                                                                        | 18 |
| 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....                                                           | 18 |
| 1.1 Toxicometabolômica.....                                                               | 18 |
| 1.2 Toxicologia dos anestésicos locais.....                                               | 19 |
| 1.3 Articaína e neurotoxicidade .....                                                     | 20 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                              | 21 |
| 2.1 Materiais.....                                                                        | 21 |
| 2.2 Cultivo celular <i>in vitro</i> e teste de viabilidade celular .....                  | 22 |
| 2.3 Metabolômica <i>in vitro</i> baseada em RMN de <sup>1</sup> H.....                    | 22 |
| 2.4 Determinação da taxa de consumo oxigênio e da taxa de acidificação extracelular ..... | 26 |
| 2.5 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting .....                          | 27 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                           | 28 |
| 3.1 Determinação da viabilidade celular .....                                             | 28 |
| 3.2 Metabolômica.....                                                                     | 31 |
| 3.3 Medidas das taxas de consumo de oxigênio e de acidificação extracelular .....         | 44 |
| 3.4 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting .....                          | 48 |
| 4. CONCLUSÃO DA PARTE 1 .....                                                             | 50 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS PARTE 1 .....                                                     | 51 |
| IV. PARTE 2.....                                                                          | 52 |
| 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....                                                           | 52 |
| 1.1 Excipientes Funcionais.....                                                           | 52 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                              | 54 |
| 2.1 Materiais.....                                                                        | 54 |
| 2.2 Quantificação de articaína por CLAE e verificação da metodologia analítica.....       | 54 |
| 2.3 Preparo dos NLC.....                                                                  | 55 |
| 2.4 Planejamento experimental .....                                                       | 56 |
| 2.5 Caracterização físico-química dos NLC.....                                            | 56 |
| 2.6 Estabilidade física .....                                                             | 58 |
| 2.7 Teste de liberação <i>in vitro</i> .....                                              | 58 |

|                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.8 Estudo <i>in vitro</i> da viabilidade celular .....                             | 59  |
| 2.9 Testes <i>in vivo</i> utilizando peixe-zebra .....                              | 59  |
| 2.10 Testes <i>in vivo</i> em modelos murino .....                                  | 61  |
| 2.11 Estudo farmacocinético (microdiálise local em tecido inflamado) .....          | 62  |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                     | 64  |
| 3.1 Quantificação de articaína por CLAE e verificação da metodologia analítica..... | 64  |
| 3.2 Testes preliminares para escolha dos excipientes .....                          | 66  |
| 3.3 Planejamento Experimental.....                                                  | 70  |
| 3.4 Caracterização físico-química das amostras escolhidas .....                     | 83  |
| 3.5 Estabilidade Física.....                                                        | 84  |
| 3.6 Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....                                       | 86  |
| 3.7 Testes em peixe-zebra .....                                                     | 87  |
| 3.8 Seleção das formulações .....                                                   | 95  |
| 3.9 Microscopia eletrônica de transmissão.....                                      | 96  |
| 3.10 Calorimetria Diferencial de Varredura e difração de Raios-X.....               | 97  |
| 3.11 Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....                                           | 100 |
| 3.12 Testes <i>in vivo</i> em modelos murino .....                                  | 103 |
| 3.14 Estudo farmacocinético (microdiálise local em tecido inflamado) .....          | 107 |
| 4. CONCLUSÕES PARTE 2 .....                                                         | 112 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS PARTE 2 .....                                               | 113 |
| V. REFERÊNCIAS .....                                                                | 114 |
| VI. ANEXOS .....                                                                    | 133 |

## **I. INTRODUÇÃO**

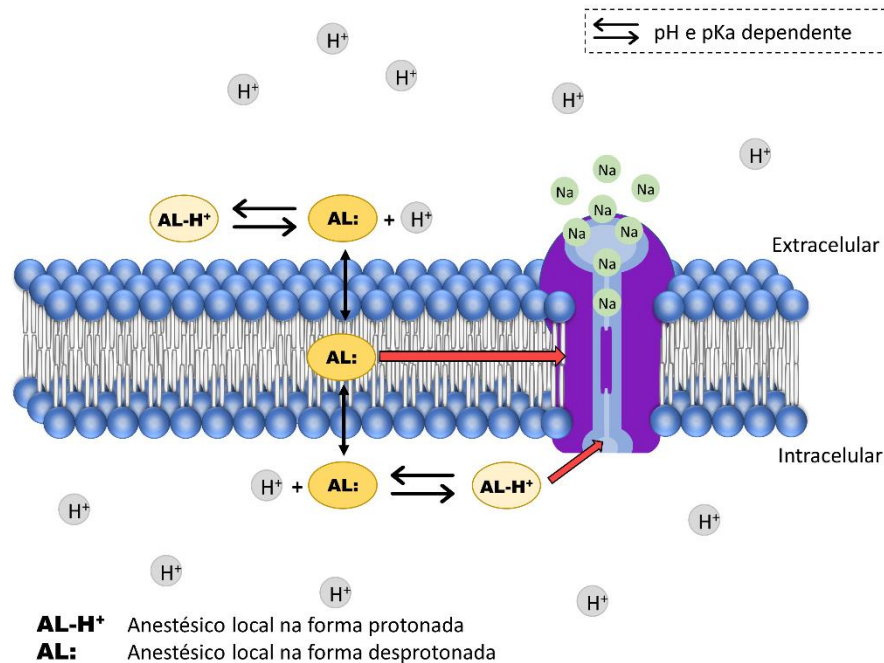
### **1. ANESTÉSICOS LOCAIS**

A associação internacional dos estudos de dor (IASP) define dor como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a dano tecidual real ou potencial (RAJA et al., 2020). Essa sensação sensorial e emocional processada pelo sistema nervoso central ocorre através de uma cascata de sinalização induzida por estímulos nocivos e transmitidas por receptores específicos, os nociceptores (KHAN; KHAN; KIM, 2019) . Assim, a percepção da dor pode ser bloqueada, ou minimizada, pela inibição da ativação desses nociceptores. Agentes antinociceptivos incluem várias classes de medicamentos como os AL, analgésicos, opióides, anti-inflamatórios e barbitúricos (GERNER; WANG, 2010).

Os AL são moléculas capazes de interromper a geração do potencial de ação e prevenir a transmissão da informação nociceptiva para o sistema nervoso central (SEWARD, 1981). Sendo assim, os AL previnem, reversivelmente a geração e condução de impulsos nervosos na região onde são aplicados, sem afetar a consciência do paciente (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; MALAMED, 2013).

Os AL comerciais têm sua estrutura caracterizada por uma fração hidrofílica e outra hidrofóbica, separadas por uma cadeia intermediária polar, com ligação éster ou amida (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012), que determina a atividade e biotransformação do agente anestésico. Sua solubilidade aquosa é, em geral, determinada pelo grupamento amina da porção hidrofílica, que é a parte ionizável da molécula. A potência e toxicidade relacionam-se com a porção lipofílica do AL (em geral um anel aromático), responsável por sua inserção na membrana da célula nervosa (GAZI; SAKATA; ISSY, 2008). A maior parte dos AL apresenta pKa entre 7,6-8,9, o que implica na existência de uma fração que se apresenta na forma neutra (com maior partição em membranas) e outra protonada (mais solúvel e que é responsável pela velocidade de ação) em pH fisiológico (DE ARAUJO; DE PAULA; FRACETO, 2008). O mecanismo de ação dos AL envolve sua interação com a proteína canal de sódio voltagem-dependente, seja pela ligação da forma protonada na interface interna da membrana neuronal (FRAZIER; NARAHASHI; YAMADA, 1970), seja pela interação da forma neutra com alças intracelulares da cadeia alfa do canal (RAGSDALE et al., 1994, 1996) inativando-o e impedindo a propagação do estímulo nervoso (Figura 1). No entanto, a direta relação entre hidrofobicidade do agente anestésico e sua potência, bem como a necessidade de concentrações da ordem de dezenas de milimolar para manutenção dos níveis

de anestesia (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019) justificam a “hipótese do lipídio”, que aponta a interação dos AL com a fase lipídica da membrana como determinante para a inativação, reversível, do canal de sódio (DE ARAUJO; DE PAULA; FRACETO, 2008). Assim, tanto a forma neutra quanto a protonada dos AL têm papel decisivo no bloqueio sensorial.



**Figura 1.** Mecanismo de ação dos anestésicos locais (AL). Adaptado de: de Araújo, de Paula, Fraceto, 2008.

A interação dos AL não é específica a canais de sódio voltagem dependente. A literatura mostra várias evidências da interação de AL com outras proteínas, principalmente de membrana, como: calmodulina, canais de potássio, receptores de acetilcolina, ATPases microsossomais e mitocondriais, citocromo oxidase, proteína G, proteína EnvZ, receptores de serotonina 1A, proteína tirosina quinase, receptores de opioides, etc. A interação com outras proteínas pode explicar o potencial dos AL para outras finalidades terapêuticas. Dentre atividades farmacológicas já descrita para AL como LDC e bupivacaína, como anti-inflamatórias (CASSUTO; SINCLAIR; BONDEROVIC, 2006; FISHER; HOLLMANN; DURIEUX, 2000; GRAY et al., 2016) e antitumorais (CHANG et al., 2014; DE MOURA et al., 2021; GERONIMO et al., 2021; HU et al., 2016; WANG et al., 2016). Porém o mecanismo de ação responsável por esses efeitos ainda não foi completamente elucidado.

## 2. FALHA ANESTÉSICA

A falha anestésica, ou um menor grau de analgesia, frequentemente ocorre na presença de inflamação, e é bastante comum (70% dos casos) em procedimentos odontológicos (BERDE; STRICHARTZ, 2016), quando processos de pulpíte ou periodontite estão instalados (UENO et al., 2008a). Especificamente no caso de pulpíte, há relatos de falha anestésica do nervo alveolar inferior em aproximadamente 30 a 45% dos casos (COHEN; CHA; SPÅNGBERG, 1993; POTOČNIK; BAJROVIĆ, 1999). Fatores fisiológicos como maior fluxo sanguíneo, além da alteração de pH e maior sensibilização nervosa são apontados como razões da falha anestésica (MILLER et al., 2014).

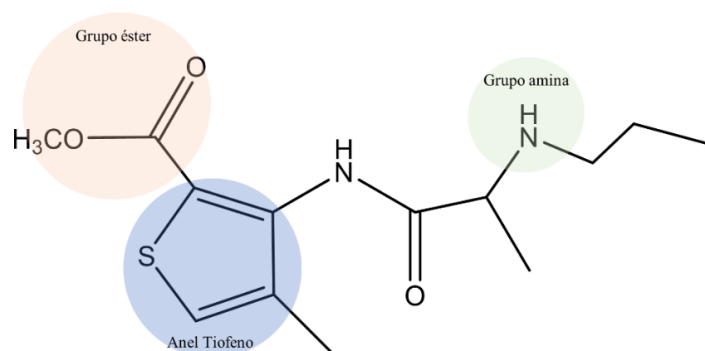
A principal teoria para explicar a falha anestésica relaciona a acidose instalada no tecido inflamado com a redução na potência anestésica dos fármacos administradas (BECKER; REED, 2012; MEECHAN, 1999; UENO et al., 2008a). Em geral, o pKa dos AL é próximo ao fisiológico (7,4), no qual frações das formas neutra e protonada são encontradas. Em caso de acidose, aumenta a fração de anestésico na forma protonada, cuja interação com a membrana biológica é mais fraca (UENO et al., 2008a, 2008b). Por exemplo, o coeficiente de partição em membranas modelo da forma neutra da lidocaína é 5 vezes maior que o da protonada (STRICHARTZ et al., 1990). Desta forma, a atividade terapêutica ineficaz se daria pela baixa disponibilidade do AL na forma neutra, com maior solubilidade na membrana biológica, onde está seu sítio de ação. Outro mecanismo proposto é o da hiperalgesia causada por vários mediadores inflamatórios (ROCHA et al., 2007), tal que um estímulo mínimo seria capaz de desencadear a condução nervosa (MEECHAN, 1999). Neste caso, haveria a necessidade de aumentar a concentração anestésica para obter a ação antinociceptiva desejada. No entanto, o aumento da dose do AL eleva o risco de toxicidade sistêmica do fármaco, limitando a dose total administrada (GRANT et al., 1997). Assim, não existem alternativas eficazes para a anestesia local em casos de patologias inflamatórias, principalmente odontológicas. Por isso, um dos focos deste trabalho (Parte 2) é desenvolver um sistema com maior eficácia, utilizando nanotecnologia, a fim de solucionar este problema clínico, com o anestésico articaína.

## 3. ARTICAÍNA

A ATC (Figura 2) foi lançada no mercado em 1984, com aspectos inovativos únicos dentro das classes dos AL, quanto à sua estrutura química. Mesmo sendo classificado dentro das classes dos anestésicos do grupo amino-amida, ela apresenta um anel tiofeno (SEWARD, 1981), como aromático, ao invés de um anel benzeno – mais comum (DE ARAÚJO; RIBEIRO;

DE PAULA 2019) e, ligado a este, um grupamento éster. Seu uso tem se tornado cada vez mais popular nos últimos 20 anos, tornando-a o segundo AL mais utilizado em odontologia (BARTLETT; MANSOOR, 2016; KAKROUDI; MEHTA; MILLAR, 2015) após a LDC. Malamed e col. propuseram que o anel tiofeno conferiria à ATC uma maior lipofilicidade e habilidade de atravessar melhor as barreiras teciduais (MALAMED; GAGNON; LEBLANC, 2000). Entretanto, estudos recentes mostram que a ATC tem um coeficiente de partição (P) entre fosfatidilcolina de ovo/água uma ordem de grandeza menor que a LDC (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019), e se insere na cabeça polares de lipossomas (PRATES et al., 2020), um comportamento similar a AL mais hidrofílicos (FRACETO et al., 2005). Coerentemente, a solubilidade aquosa da ATC na forma neutra (62,1 mM) é alta em relações aos outros anestésicos amino-amida (LDC = 13,1 mM) (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019), o que pode explicar sua melhor difusão tecidual. Além disso, o *onset* de ação da ATC é rápido (2-3 min para bloqueios em odontologia), comparável ao dos agentes anestésicos mais hidrofílicos (LDC, prilocaína, mepivacaína).

Outra característica da ATC é seu grupamento éster, adicional ao grupo amina ionizável, que lhe confere rápida hidrólise por esterases plasmáticas (KAKROUDI; MEHTA; MILLAR, 2015). A ATC possui curta meia-vida (20 – 27 min.) na corrente sanguínea, o que reduz sua toxicidade sistêmica, em comparação a outros AL (ONAL; SALTALI; APILIOGULLARI, 2016). Assim, a concentração comercializada para anestesia infiltrativa com ATC é de 4 %, a mais alta entre os AL de uso odontológico como a prilocaína (3%), LDC (2-3%) e mepivacaína (2%) e significativamente maior que a de agentes anestésicos mais hidrofóbicos como a tetracaína, bupivacaína, ropivacaína ou etidocaína (0,5%) (MALAMED, 2013). Com a possibilidade de uso de dose maior, tem sido relatado na literatura que, o uso da ATC em casos de inflamação pulpar levou a um ligeiro aumento na eficácia anestésica, seja ela livre (MONTEIRO et al., 2015; NAGENDRABABU et al., 2020; PETERS; BOTERO, 2017) ou encapsulada em lipossomas (DA SILVA et al., 2016). Por todas estas características, nesta tese ATC foi escolhida para ser encapsulada em NLC visando aumento da anestesia em tecidos inflamados.



**Figura 2.** Estrutura química da articaína (ChemDraw 21.0 software).

## **II. OBJETIVO**

Esta tese está dividida em duas partes, cujos objetivos foram: Parte 1) Estudar o efeito da ATC no metabolismo celular *in vitro*, através da técnica de metabolômica por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H), em comparação com o AL padrão LDC, a fim de elucidar mecanismos de sua toxicidade celular e, Parte 2) Desenvolver nanoformulações de base tecnológica, inovadoras e contendo ATC, para bloqueio da dor em locais com processos inflamatórios instalados.

### **1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos das duas partes desta tese são apresentados a seguir.

#### **1.1 Parte 1**

Nesta parte da tese estudos de citotoxicidade utilizando metabolômica de RMN-<sup>1</sup>H foram conduzidos em duas linhagens celulares pertencentes ao sistema nervoso *in vitro* (células de Schwann (ou neurolemócitos) e células neuronais derivadas de neuroblastoma – SH-SY5Y) tratadas com ATC. O estudo nas células de Schwann são descritas nesta tese, enquanto os resultados com as células neuronais SH-SY5Y já foram publicados e são apresentados no fim desta parte. Os objetivos específicos com as células de Schwann foram:

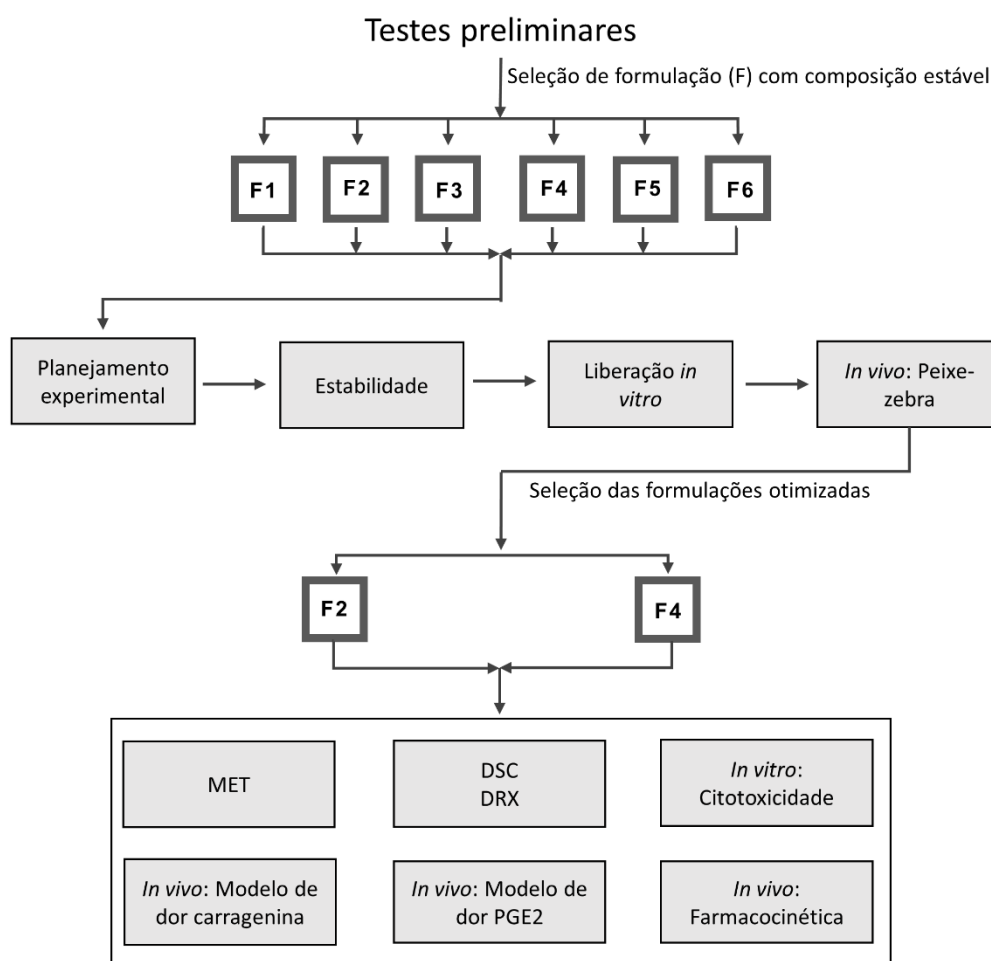
- a) Determinar a viabilidade celular e metabolômica por RMN das células após tratamento (24 horas) com ATC, em comparação com LDC, em duas doses (IC10 e IC50).
- b) Determinar a taxa de consumo de oxigênio e a taxa de acidificação extracelular das células, no equipamento Seahorse, após tratamento (24 horas) com ATC, em comparação com LDC.
- c) Determinar por Western Blotting, a expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, além do estresse do retículo endoplasmático e indução de apoptose, em células tratadas com ATC ou LDC.
- d) Correlacionar os resultados de metabolômica, consumo de oxigênio e Western Blotting para compreender os efeitos da ATC no metabolismo celular em relação à LDC.

#### **1.2 Parte 2**

Nesta parte, os objetivos específicos de preparo e caracterização de formulações de liberação sustentada de ATC em carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC), foram:

- A partir de 6 composições de NLC pré-definidas, selecionar por planejamento experimental e peixe-zebra aquelas com as concentrações ideais de excipientes e atividade biológica desejáveis.
- Caracterizar as formulações otimizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e difratometria de Raios-X (DRX).
- Testar a citotoxicidade das formulações otimizadas *in vitro*, em células de Schwann.
- Testar *in vivo*, em roedores, usando dois modelos de dor inflamatória (carragenina e prostaglandina E2, PGE2), para avaliar a eficácia das formulações otimizadas, bem como elucidar o mecanismo de ação antinociceptiva, da ATC e do excipiente óleo de copaíba (OC).
- Avaliar a farmacocinética da formulação otimizada, em comparação com a ATC livre, através da técnica de microdiálise *in situ*, em roedores.

A Figura 3 ilustra as etapas descritas nesta parte (2).



**Figura 3.** Fluxograma dos experimentos relativos à parte 2 da tese.

### III. PARTE 1

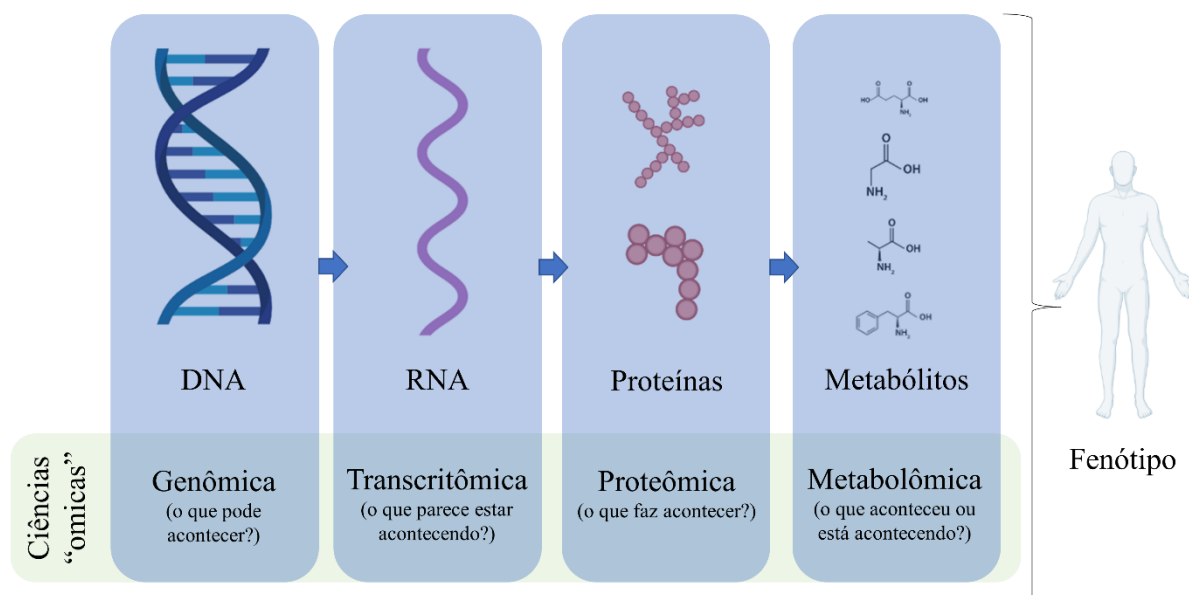
#### TOXICOMETABOLÔMICA

**Utilização de metabolômica de RMN-<sup>1</sup>H para estudo das alterações metabólicas induzidas por articaína, comparativamente à lidocaína, em células neuronais a fim de elucidar seu mecanismo de neurotoxicidade**

#### 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

##### 1.1 Toxicometabolômica

No processo canônico da biologia celular, o ácido desoxirribonucleico (DNA) é transcrito em ácido ribonucleico (RNA), que por sua vez é responsável pela síntese de proteínas. A atividade proteica (enzimática) leva à produção de milhares de moléculas menores, denominadas de metabólitos (Figura 4). Assim, os metabólitos são a parte final de todo um processo regulado, sendo as moléculas mais próximas representativas da atividade bioquímica em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos (GOMASE et al., 2008).



**Figura 4.** Papel das ciências "ômicas" no contexto da biologia molecular. Adaptado de (ARAÚJO et al., 2021).

Para cada etapa do processo, do DNA aos metabólitos, existe uma ciência "ômica" envolvida. A ciência "ômica" aplicada aos metabólitos, ou metabolômica, se refere ao estudo das mudanças dos metabólitos de baixo peso molecular (<1 kDa) em amostras biológicas como

biofluidos, células ou tecidos, em resposta a diferentes estímulos (DUARTE et al., 2009; QUARTIERI et al., 2022). Se considerarmos os metabólitos como sendo o final de toda uma cascata de processos celulares, teciduais ou de um organismo frente a alterações fisiológicas ou patológicas, a metabolômica se torna uma das ferramentas mais preditivas do fenótipo do objeto em estudo (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007). Para além disso, o metaboloma reflete a influência de fatores externos, como dieta, medicação ou exposição a agentes ambientais (RYAN; ROBARDS, 2006).

A metabolômica tem sido uma abordagem amplamente explorada em estudos sobre o desenvolvimento de fármacos, mecanismos de morte celular, de processos patológicos, etc. (DUARTE et al., 2009). A toximetabolômica (metabolômica aplicada a estudos toxicológicos) vem despontando como uma ferramenta poderosa nos campos da toxicologia alimentar, ambiental, forense (ARAÚJO et al., 2021) e como nova ferramenta em toxicologia regulatória (OLESTI et al., 2021). Com seu uso é possível estudar a toxicologia de fármacos (estudo pré-clínico e/ou clínico), por ser possível a análise da perturbação que estes podem trazer ao metabolismo normal e, consequentemente, apontando alterações em vias canônicas normais (ARTATI; TOKARZ, 2020; COMBRINK; LOOTS; DU PREEZ, 2020; GRIFFIN, 2020).

As duas técnicas mais utilizadas para o estudo metabolômico são a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear (RMN). Ambas possuem vantagens e desvantagens, sendo que as vantagens das medidas por RMN residem na maior simplicidade de preparo das amostras (já que não é necessária a ionização/derivatização dos componentes), capacidade de distinção de compostos de mesma massa molecular e monitorização dinâmica das transformações metabólicas, especialmente através do uso de substratos marcados com isótopos estáveis. Para além disso, a RMN é uma técnica altamente reproduzível, não-destrutiva (permitindo a recuperação das amostras) e quantitativa. A sua maior limitação é a baixa sensibilidade, já que, tipicamente, só consegue detectar compostos presentes em concentrações superiores a alguns micromolar (MARKLEY et al., 2017).

## **1.2 Toxicologia dos anestésicos locais**

Todo AL apresenta neutotoxicidade dose-dependente (MALAMED, 2016). Uma das principais alterações toxicológicas desencadeadas por eles referem-se à bioenergética celular, relatadas desde os anos 60 (MELA, 1969). Devido as suas características lipofílicas, AL não só perturbam a integridade da membrana plasmática, mas também da mitocondrial (NOUETTE-GAULAIN et al., 2011). Assim, relatos de efeitos em proteínas de membranas mitocondriais ocasionando disfunção da cadeia de transporte de elétrons e da F1-ATPase (ADADE;

CHIGNELL; VANDERKOOI, 1984; CELA et al., 2010; CHAZOTTE; VANDERKOOI, 1981; DABBENI-SALA; PALATINI, 1990), desacoplamento da fosforilação oxidativa (DABADIE et al., 1987; TERADA et al., 1990), quebra do gradiente prótons (NOUETTE-GAULAIN et al., 2009), inibição da adenina nucleotídeo translocase mitocondrial (SPENCER; BYGRAVE, 1974) e alteração na concentração de íons cálcio (MELA, 1969) são descritos e atribuídos a toxicidade causada por AL. Todos esses efeitos levam a uma diminuição na síntese de ATP e a uma diminuição no conteúdo de ATP da célula (LA MONACA; FODALE, 2012). Além disso, a miotoxicidade dos AL pode ser causada pela inibição do transporte de ácidos graxos pelo sistema da carnitina acil-transferase, afetando o metabolismo lipídico como demonstrado em mitocôndrias cardíacas (GARLID; NAKASHIMA, 1983).

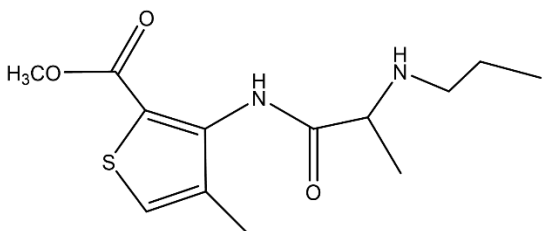
### 1.3 Articaina e neurotoxicidade

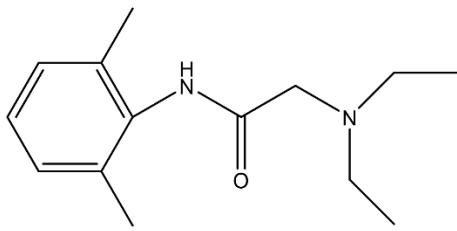
Como dito anteriormente, todos os AL possuem neurotoxicidade. Contudo AL como a ATC e prilocaína são utilizados na clínica em altas concentrações (4 e 3%, respectivamente). Devido a este fato, a literatura descreve que a incidência de casos de parestesia (lesão no nervo) é maior quando estes dois agentes anestésicos são utilizados, em relação à LDC (GARLSTO et al., 2010; HOPMAN; BAART; BRAND, 2017). Apesar de a neurotoxicidade dos AL ser conhecida, não existem na literatura trabalhos que comparem a toxicidade dos diferentes agentes anestésicos, explicando, por exemplo os casos de parestesia (APS; BADR, 2020) e se a dose é a causa determinante nos casos de parestesia. Inserindo-se neste contexto, não foi encontrada nenhuma evidência de que a ATC possua neurotoxicidade maior que a de outros anestésicos, ou se existe uma diferença significativa nos testes de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, sendo assim necessário mais pesquisas moleculares a este respeito (HOPMAN; BAART; BRAND, 2017; MALAMED, 2016; STIRRUP; CREAN, 2019).

Dentro deste contexto, a toxicometabolômica é uma ferramenta promissora para trazer novas percepções sobre as respostas neurocitotóxicas dos AL. A ATC, sendo um AL relativamente novo no mercado e com uma estrutura química peculiar, possui uma literatura escassa sobre sua neurotoxicidade (WERDEHAUSEN et al., 2012; WU et al., 2018) que não evidencia diferenças em relação a LDC, por exemplo. Assim, o estudo realizado neste trabalho é pioneiro, e de importância para a literatura, já que avaliar um AL muito usado na clínica odontológica, administrado em alta concentração, com estrutura química única e com vários relatos de dano ao tecido nervoso.

Como comparação para este estudo toxicometabolômico da ATC, utilizamos a LDC (Figura 5), que é o AL amino-amida mais comum na prática médica, sendo considerado um

“gold standard” em anestesia local (KATYAL, 2010; ZHANG et al., 2019). Em relação a ATC, a lidocaína possui o mesmo pKa (7,8), maior lipossolubilidade, menor solubilidade aquosa (13,1 mM na forma neutra) e meia vida 3 vezes maior (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019). Devido a sua metabolização hepática, que aumenta sua toxicidade sistêmica em relação a ATC, a lidocaína é comercializada a 2% (JESKE, 2019). Embora bastante utilizada, há relatos *in vitro* de sua citoneurotoxicidade (PEREZ-CASTRO et al., 2009), por mecanismos como a disrupção do citoesqueleto (HASCHKE; BYERS; FINK, 1974; NICOLSON; SMITH; POSTE, 1976) e a ativação do mecanismo de apoptose (KAMIYA; OHTA; KANEKO, 2005) em diversos tipos celulares. Em suma, a LDC afeta a estrutura das membranas plasmática e mitocondrial, causando alterações na estrutura celular, na bioenergética e ativando mecanismo de morte celular de forma dose-dependente.

|  <p>ARTICAÍNA - ATC</p> |         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Propriedades                                                                                              |         |
| Coeficiente de partição (P) <sup>a</sup>                                                                  | 10      |
| Solubilidade aquosa da forma neutra                                                                       | 62,1 mM |
| Meia vida plasmática                                                                                      | 20 min  |
| Concentração comercial                                                                                    | 4 %     |

|  <p>LIDOCAÍNA - LDC</p> |         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Propriedades                                                                                               |         |
| Coeficiente de partição (P) <sup>a</sup>                                                                   | 144     |
| Solubilidade aquosa da forma neutra                                                                        | 13,1 mM |
| Meia vida plasmática                                                                                       | 1,5 h   |
| Concentração comercial                                                                                     | 2 %     |

**Figura 5.** Comparação entre as estruturas e algumas propriedades da articaína e da lidocaína. <sup>a</sup> Determinada entre fosfatidilcolina de ovo/tampão aquoso, para as formas neutras. Adaptado de: (SILVA et al., 2022).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), soro fetal bovino, penicilina, sulfato de estreptomicina, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) e cloridrato de LDC foram obtidos em Sigma-Aldrich (MA, USA). O cloridrato de ATC foi doado pela empresa DFL Ind. Farm. A linhagem de células de Schwann (RSC96) foi adquirida da “American Type Culture Collection” (ATCC, EUA).

## 2.2 Cultivo celular *in vitro* e teste de viabilidade celular

Células da linhagem RSC96 (células neuronais de Schwann de *Rattus norvegicus* de imortalização espontânea; ATCC® CRL-2765) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100 UI.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg.mL<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina). As células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas a 37 °C sob atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub> por 48 horas, até atingirem a semi-confluência. Todos os experimentos foram realizados em células entre as passagens 6 a 12.

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o método do cloreto de tetrametiltetrazólio (MTT). Esse método avalia a capacidade de células viáveis reduzirem o sal de tetrazólio à formazan, composto insolúvel e de coloração roxa (MOSMANN, 1983). Para tanto, o meio de cultura presente em cada poço da placa de 96 poços (plaqueada 24 horas antes, na densidade de 4 x 10<sup>4</sup> células.mL<sup>-1</sup>), foi substituído pelas amostras diluídas dos AL em meio DMEM suplementado (de 0,25 a 9 mM) e as células foram incubadas por 24 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Depois desta etapa, o meio foi removido, lavado com PBS 5mM e as células foram incubadas com MTT por 3 horas. Ao final desse período, o meio contendo MTT não reduzido foi removido e álcool etílico foi adicionado para dissolução dos cristais de formazan produzidos. As placas foram agitadas vigorosamente para solubilização do formazan, cuja absorbância foi lida em 570 nm (WELDER, 1992). Foram realizadas 4 réplicas para cada concentração testada e o experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular em relação ao controle e tratados com o software GraphPad Prism® 6.0.

## 2.3 Metabolômica *in vitro* baseada em RMN de <sup>1</sup>H

### 2.3.1 Exposição das células aos tratamentos

Após atingir a semi-confluência, 10 mL de células (1×10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>) foram plaqueadas em placas de cultura de 100 mm de diâmetro e incubadas por 24 horas. Cada placa foi exposta à concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 10% (IC10) e 50 % (IC50), com LDC ou ATC. Em seguida as células retornaram à incubação por 24 horas, sempre em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após coleta do meio e lavagem das placas, as células foram extraídas, como descrito abaixo. Cada exposição foi realizada em duplicada, em 3 diferentes ensaios.

### 2.3.2 Coleta das amostras para as medidas de RMN (extração)

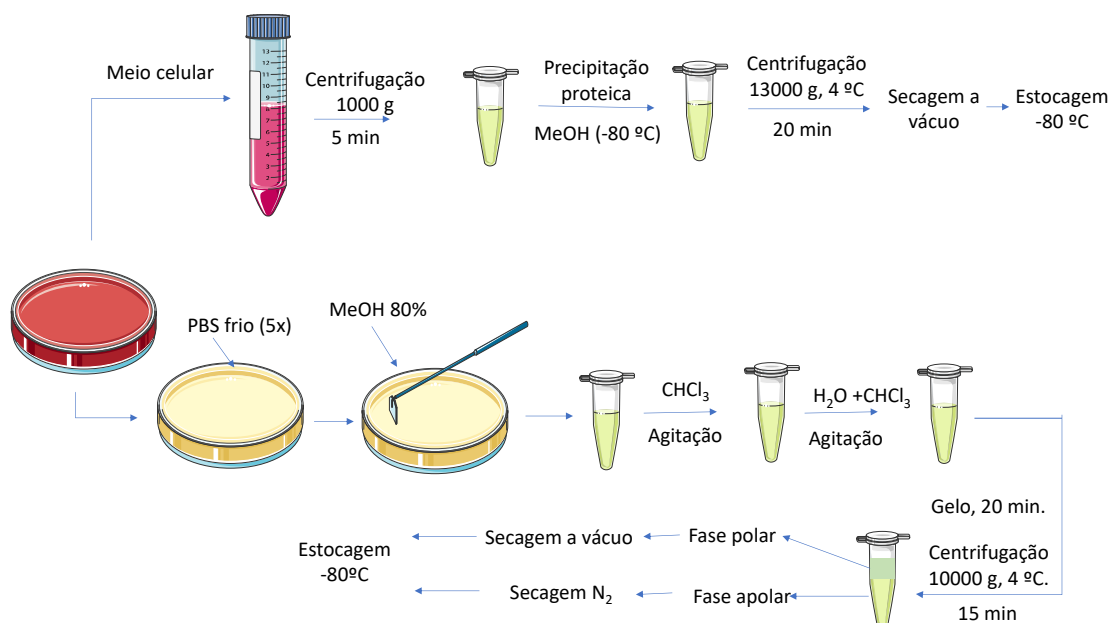
#### 2.3.2.1 Processamento do meio de cultura

Os meios de cultura foram coletados de cada placa (incluindo meio sem células, nas mesmas condições de incubação) em tubos cônicos e centrifugados a 1000x g por 10 min. O sobrenadante (300 µL) foi coletado e submetido ao protocolo de precipitação proteica (KOSTIDIS et al., 2017). Neste, 600 µL de metanol 100% (v/v) a -80 °C foi adicionado ao sobrenadante coletado (na proporção 1:3). As alíquotas foram mantidas a -20 °C por 30 min e então centrifugadas a 13000x g por 20 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e secado a vácuo (SpeedVac, Eppendorf). As amostras secas foram estocadas a -80 °C até a aquisição dos espectros de RMN. Para as análises de RMN, as amostras secas foram ressuspensas em 600 µL de tampão fosfato deuterado (PBS 100 mM, pH 7) contendo 0,1 mM de 3-(trimetilsilil) ácido propanóico (TSP-d4), e 550 µL de cada amostra foi transferido para tubos de RMN de 5 mm.

#### 2.3.2.2 Extração celular

Para a extração dos metabólitos celulares foi utilizado o protocolo com extração bifásica (metanol:clorofórmio:água; 1:1:0,7) (Figura 6) (CARROLA et al., 2016). Assim, após remoção do meio de cultura, as placas contendo as células foram lavadas 4 vezes com 5 mL de PBS, gelado. Depois, 800 µL de metanol gelado (80% v/v) foi adicionado para lisar e parar a atividade metabólica celular. Após, as células foram raspadas da placa de cultura e transferidas para microtubos contendo 150 mg de esferas de vidro e agitadas em agitadores tipo vortex por 2 min. Em seguida, 320 µL de clorofórmio (-20 °C) foi adicionado e o microtubo foi agitado por mais 2 min, seguindo-se a adição de mais 320 µL de clorofórmio (-20 °C) e 288 µL de água desionizada. Após a adição os tubos foram agitados por mais 2 min e colocados em banho de gelo para repouso, por 20 min. As amostras foram, então, centrifugadas a 10000x g por 15 min, a 4 °C. Por fim, 400 µL da fase orgânica (inferior) foi coletado para um frasco de vidro âmbar de 2 mL e seco sob fluxo de nitrogênio. Da fase superior (aquosa) 800 µL foram coletados e transferidos para um microtubo, para secagem sob vácuo (SpeedVac, Eppendorf). Ambas as fases, após secagem, foram estocadas a -80 °C até a realização das análises de RMN.

Para as análises de RMN, a fase polar seca foi ressuspensa em 600 µL de tampão fosfato deuterado (PBS 100 mM, pH 7) contendo 0,1 mM de TSP-d4. A fase lipídica foi ressuspensa em 600 µL de clorofórmio deuterado contendo 0,03% de tetrametil silano (TMS). Em ambas os casos, 550 µL de cada amostra foi transferido para tubos de RMN de 5 mm.



**Figura 6.** Esquema de extração dos metabólitos do meio de cultura de células.

### 2.3.3 Aquisição dos espectros de RMN- $^1\text{H}$

Todas as amostras foram analisadas no espectrômetro de RMN Bruker Avance III HD 500 (Universidade de Aveiro, Rede Nacional de RMN, Portugal) operado a 500,13 MHz para observação de  $^1\text{H}$ , a 298 K, usando uma sonda Bruker 5 mm TXI 5 mm. Espectros 1D  $^1\text{H}$  com pré-saturação de água (programa do pulso 'noesypr1d', Bruker library; RD-90°-t-90°-tm-90°-ACQ, t tendo um pequeno atraso de 3  $\mu\text{s}$ ) foram adquiridos com 32k de pontos, 7002,801 Hz de faixa espectral, a 2 s de período de atraso e 512/2048 scans (para meio/extrato polar, respectivamente). Para os extratos lipídicos, o espectro 1D  $^1\text{H}$  foi adquirido usando-se uma sequência de pulsos padrão Bruker *proton* ('zg') com um pulso de 90°. O tempo de aquisição (ACQ) para cada FID foi de 2,34 s e o período de atraso de 2 s. Espectros foram processados com o programa Topspin 3.2 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). Cada FID foi *zero-filled* para 64 k pontos e multiplicado por uma função cosseno (ssb 2), anterior à transformada de Fourier. Espectros foram ajustados manualmente em relação a fase e linha de base e os deslocamentos químicos foram referenciados pelos padrões internos TSP (nos meios e extratos polares) ou TMS (extratos lipofílicos). A Tabela 1 resume os parâmetros de aquisição e processamento dos experimentos 1D. Espectros 2D-RMN foram coletados para amostras selecionadas visando a identificação metabólica, a saber:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, J-resolved e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC. A atribuição de metabólitos foi baseada na correspondência das informações espectrais 1D e 2D com os espectros de referência disponíveis no Chenomx NMR Suite v. 8.5 (Chenomx

Inc., Canada); BBIOREFCODE-2-0-0 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) e *Human metabolome database* (HMDB, 2010).

**Tabela 1.** Principais parâmetros utilizados para a aquisição e processamento de espectros de 500 MHz 1D RMN-<sup>1</sup>H de meios de cultura, extratos polares e extratos lipofílicos.

|                                    | Meio de cultura | Extrato polar | Extrato apolar |
|------------------------------------|-----------------|---------------|----------------|
| <b>Parâmetros de aquisição</b>     |                 |               |                |
| Programa do pulso*                 | noesypr1d       | noesypr1d     | zg             |
| FID data points, TD                | 32768           | 32768         | 32768          |
| Número de <i>scans</i>             | 512             | 512           | 512            |
| Faixa espectral (ppm)              | 14,0019         | 14,0019       | 14,0019        |
| Período de atraso, RD (s)          | 2               | 2             | 2              |
| <i>Mixing time</i> , tm (ms)       | 100             | 100           |                |
| <b>Parâmetros de processamento</b> |                 |               |                |
| Função de apodização               | Co-seno         | Co-seno       | Co-seno        |
| Spectrum data points, SI           | 65536           | 65536         | 65536          |

\*biblioteca Bruker

### 2.3.4 Análise multivariada

Após processamento, os espectros foram visualizados e preparados para análise multivariada no software Amix-Viewer 3.9.15 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). Cada espectro foi normalizado por sua área total e excluídas a região de supressão de água e de alguns contaminantes solventes residuais como clorofórmio, etanol e metanol. Além disso, nos meios de cultura foram excluídas todas as regiões da LDC e ATC, obtidas a partir dos espectros acelulares (puro) desses fármacos puros. Os dados foram organizados em matrizes ('bucket tables'), contendo as informações das intensidades dos sinais (variáveis) de cada deslocamento químico nos diferentes espectros (observações).

A matriz de dados foi inserida no software SIMCA-P 14.1 (Umetrics, Umeå, Suíça), onde PCA (Análise dos componentes principais; *Principal Component Analysis*) e PLS-DA (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais; *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) foram aplicados. Foi utilizado *Autoscaling* (conhecido como *unit variance scaling* (UV)), no qual cada coluna contendo as intensidades de cada desvio químico é dividida por seu desvio padrão. Esse procedimento iguala a variância de todas as variáveis, permitindo que alterações nos picos de metabólitos menos abundantes tenham o mesmo peso, em modelos multivariados, que os sinais mais intensos. Os resultados foram visualizados por distribuição fatorial (*Scores*) e carga fatorial (*loadings*), coloridos de acordo com a importância à projeção (*Variable Importance in the Projection*; VIP (w.DP)). Para os modelos PLS-DA, os valores de Q<sup>2</sup> e R<sup>2</sup> que refletem a relevância preditiva e o coeficiente de determinação (variância explicada),

respectivamente, obtidos de validação cruzada interna (n=7), foram usados para avaliar a robustez da discriminação de classe.

### 2.3.5 Análise univariada

Para fornecer uma medida quantitativa das variações metabólicas, a integração espectral dos sinais selecionados e a normalização pela área total da área dos sinais selecionados foram realizadas no software Amix-Viewer 3.9.15 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanha). Para cada metabólito, a porcentagem de variação nas amostras foi calculada em relação aos respectivos controles, juntamente com o tamanho do efeito (ES)(BERBEN; SEREIKA; ENGBERG, 2012) e a significância estatística (valor de p). As variações com maior magnitude ( $|ES| > 0,8$ ) foram expressas em um *heatmap* gerado com o software R versão 3.4.1. (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

## 2.4 Determinação da taxa de consumo oxigênio e da taxa de acidificação extracelular

O analisador de fluxo extracelular Seahorse XF24 (Seahorse Bioscience, EUA) foi usado para acessar a taxa de consumo de oxigênio (do inglês, *oxygen consumption rate*, OCR) e a taxa de acidificação extracelular (do inglês, *extracellular acidification rate*, ECAR) nas células de Schwann RSC96 (CS) utilizando placas do fabricante incubadas com  $4,9 \times 10^4$  células/poço 24 horas antes do início do experimento. Após, as células foram tratadas com ATC e LDC na concentração de IC10 por 24 h antes da análise.

Para a medida de OCR, dois experimentos foram conduzidos. 1) para determinação da capacidade respiratória máxima: CS foram tratadas com 3 injeções de cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona (CCCP, 5  $\mu$ M) e uma de antimicina (1  $\mu$ M) + rotenona (1  $\mu$ M). 2) Para determinação de outros parâmetros: uma injeção de oligomicina (1  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), duas injeções de cianeto de carbonil 3-clorofenilhidrazona, CCCP, (10 + 5  $\mu$ M) e uma de antimicina (1  $\mu$ M) + rotenona (1  $\mu$ M). Os resultados de OCR foram compilados em um gráfico usando o resultado da respiração máxima obtido com o primeiro experimento de OCR e o restante, com os resultados do segundo experimento, para evitar a subestimação da respiração máxima devido à presença de oligomicina (RUAS et al., 2018).

Para o experimento de ECAR, o meio celular foi trocado por meio DMEM sem glicose e mantido em incubadora livre de CO<sub>2</sub> a 37°C, por 1 h antes do experimento. Após, foram levadas ao equipamento e realizadas três adições com glicose (10 mM), seguida de uma adição

de antimicina A + rotenona (1  $\mu$ M + 2  $\mu$ M) e uma adição de monensina + CCCP (200  $\mu$ M + 10  $\mu$ M).

Ao final dos experimentos de OCR e ECAR, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% e o número de células foi determinado por coloração com cristal de violeta e os resultados normalizados pela quantidade de células presentes. Estas análises foram realizadas em parceria com o Dr. Roger Castilho e Dra Juliana Ruas, do Departamento de Patologia da Faculdade Ciências Médicas da Unicamp.

## **2.5 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting**

Após incubação das CS por 24 horas na concentração de IC<sub>50</sub> de ATC ou LDC, o meio foi removido e as células foram lavadas com solução fisiológica (0,9% NaCl). Após a lavagem, as placas foram raspadas com o auxílio de um raspador de células e esse material obtido foi transferido para um microtubo. No precipitado obtido foi adicionado o tampão de lise (Cell lysis Buffer 1X) com a seguinte composição: 20 mM TrisHCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM pirofosfato de sódio, 1 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ g. mL<sup>-1</sup> leupeptina, 1 mM PMSF. Em seguida, o lisado celular foi sonificado em 2 ciclos de 10 s (Sonics Vibra Cell Tm) e centrifugado em centrífuga refrigerada Hettich Universal 320R (Hettich Lab Technology, Alemanha) por 14000x g por 10 minutos. A quantificação de proteínas totais foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Após a quantificação de proteínas, o tampão de amostra (Tris-HCl 100 mmol/L pH 6,8; azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1 mol/L, glicerol 20%, SDS 4%, contendo 200 mmol/L de  $\beta$ -mercaptoetanol) foi adicionado na proporção 1:1 (v/v) nos lisados celulares e as amostras foram fervidas a 100 °C por 10 minutos. Na etapa seguinte, 50  $\mu$ g de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida (12% e 10%) e submetidas à corrida de eletroforese por 1,5 horas, inicialmente a 80 Volts e depois a 120 V. Após a corrida de eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF por 2 horas a 400mA. Antes do processo de transferência, a membrana foi incubada em metanol por 10 minutos para ser ativada. Após o processo de transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução de BSA 3%. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas overnight a 4 °C sob agitação com os anticorpos primários específicos, listados na Tabela 2, na diluição de 1:1000.

Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T e incubadas 3 horas com o anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase-HRP (diluição de 1:10000). Após este período, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T. A detecção dos imunocomplexos foi realizada por

quimioluminescência com reagente ECL (eletroquimioluminescente), constituído por: solução A – 1% luminol, 0,44% de ácido cumárico em Tris-HCl pH 8,5 1M; solução B – 0,061% peróxido de hidrogênio em TrisHCl pH 8,5, 1 M. A revelação foi feita no fotodocumentador Alliance 6.7 -UVITEC (Cambridge, UK). Estas análises foram realizadas em parceria com a Dra Carmen V. F. Halder e Msc. Helon Cordeiro, do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual do IB/Unicamp.

**Tabela 2.** Fabricante e código dos anticorpos utilizados no experimento.

| ANTICORPO   | FABRICANTE     | CÓDIGO |
|-------------|----------------|--------|
| Anti-Rabbit | Cell Signaling | #7074  |
| FAS         | Cell Signaling | #3180  |
| GLUT 1      | Cell Signaling | #12939 |
| PARP        | Cell Signaling | #9532  |
| IREI 1      | Cell Signaling | #3294  |
| GAPDH       | Cell Signaling | #2118  |

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

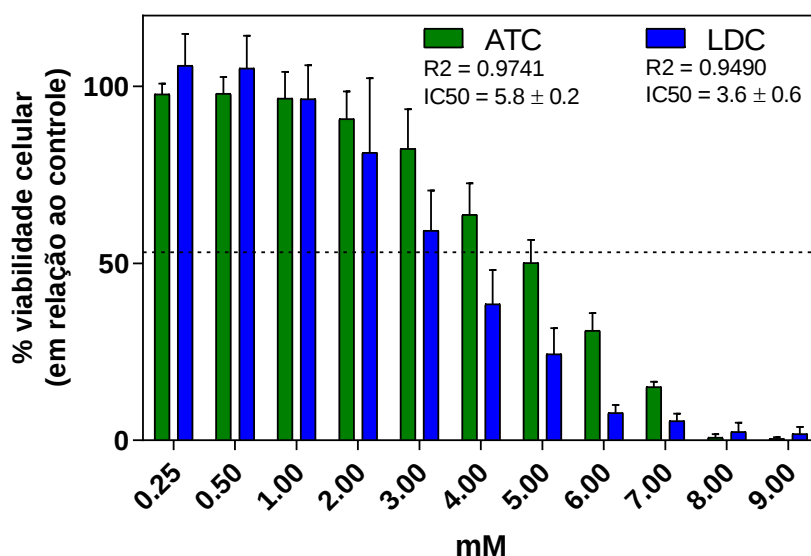
#### 3.1 Determinação da viabilidade celular

As células de Schwann (CS) constituem uma parte importante do sistema nervoso periférico. Elas são responsáveis, principalmente, por formar a bainha de mielina em torno dos axônios, fazendo parte da fibra nervosa. São também suas funções: crescimento, regeneração axonal e a condutividade eletrofisiológica normal (KIDD; OHNO; TRAPP, 2013). Assim, danos a estas células, que podem ser provocados pela ação de AL, podem desencadear patologias na função neuronal. Devido a isso, estudos de toxicidade *in vitro* de AL são importantes neste tipo celular.

Primeiramente, a fim de determinar as doses dos AL que seriam testadas no estudo de metabolômica, foi realizado o ensaio *in vitro* de viabilidade celular em CS. Os resultados deste teste são apresentados na Figura 7. Em relação ao cloridrato de ATC, o IC10 (dose necessária para diminuir a viabilidade celular em 10%) calculado foi de 2,0 mM e o IC50 (dose necessária para diminuir a viabilidade em 50%) foi de 5,8 mM. Para o cloridrato de LDC, os resultados de IC10 e IC50 foram de 1,5 e 3,6 mM, respectivamente.

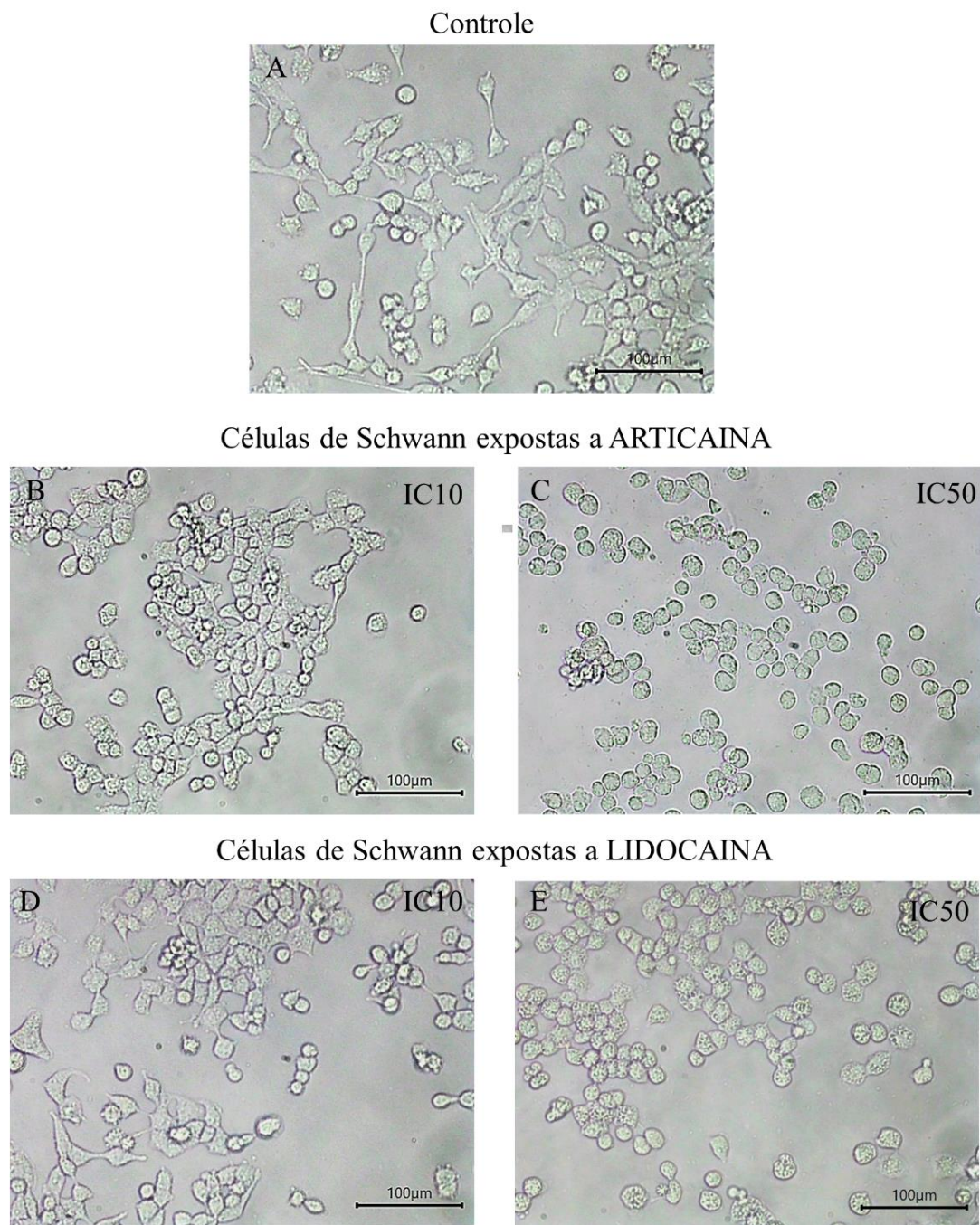
A citotoxicidade de AL sobre diferentes tipos celulares já é bem descrita na literatura (ARAÚJO et al., 2005; GRILLO et al., 2010). A citotoxicidade está relacionada a lipossolubilidade do AL, concentração e tempo de exposição (FERREIRA et al., 2016; KROG et al., 2002; RADWAN; SAITO; GOTO, 2002; YANG et al., 2011). Em cultura primária de

CS, utilizando o teste da lactato desidrogenase (LDH) como medida de morte celular, Yang e col. mostraram que após 24 horas de exposição, a LDC em uma concentração de 1,0 mM não apresentou efeito significativo na atividade de LDH, em relação ao controle (YANG et al., 2011). Da mesma forma, os resultados da Figura 7 mostram que na concentração de 1,0 mM de LDC não houve comprometimento da viabilidade celular de CS, avaliada pelo teste de MTT. Em relação a ATC há poucos testes *in vitro* relatados na literatura, porém, em fibroblastos de camundongos (3T3), no mesmo tempo de incubação, Melo e col. encontraram IC<sub>50</sub> de 4 mM (MELO et al., 2014). Assim, os valores maiores de IC<sub>50</sub> observados com ATC em relação a LDC são compatíveis com sua menor lipossolubilidade (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019), já que para o AL produzir seu efeito, ele necessita particionar na membrana, sendo a citotoxicidade diretamente relacionada ao caráter lipofílico do AL, representado pelo coeficiente de partição. As concentrações de IC<sub>10</sub> e IC<sub>50</sub> determinadas foram escolhidas para o estudo metabolômico por representarem concentrações de mínimo (IC<sub>10</sub>) e significativo (IC<sub>50</sub>) comprometimento da viabilidade celular pelo fármaco.



**Figura 7.** Viabilidade celular após 24 horas de tratamento na linhagem de células neuronais imortalizadas de Schwann RSC96 (ATCC® CRL-2765).

Em relação a morfologia celular, a Figura 8A mostra uma imagem representativa (controle) da linhagem de CS estudada, revelando células esféricas e com prolongamento citoplasmático, em conformidade com seu padrão morfológico normal (“RSC96 cell line”).



**Figura 8.** Micrografia da linhagem de células neuronais imortalizadas de Schwann RSC96 (ATCC® CRL-2765) controle **A** ou após exposição de 24 horas a articaína na concentração de IC10 **B** ou IC50 **C**; ou após exposição de 24 horas a lidocaína na concentração de IC10 **D** ou IC50 **E**. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

Sob exposição aos anestésicos na concentração de IC10 (Figuras 8B e 8D) houve uma perceptível mudança na morfologia, observando-se células mais esféricas e com menos prolongamentos, principalmente após tratamento com ATC (Figura 8B). No IC50 a alteração da morfologia celular é bem mais evidente, tanto para o tratamento com ATC (Figura 8C) quanto com LDC (Figura 8E). AL particionam na membrana celular, o que determina sua ação terapêutica (DE ARAUJO; DE PAULA; FRACETO, 2008). Entre vários AL comerciais, a

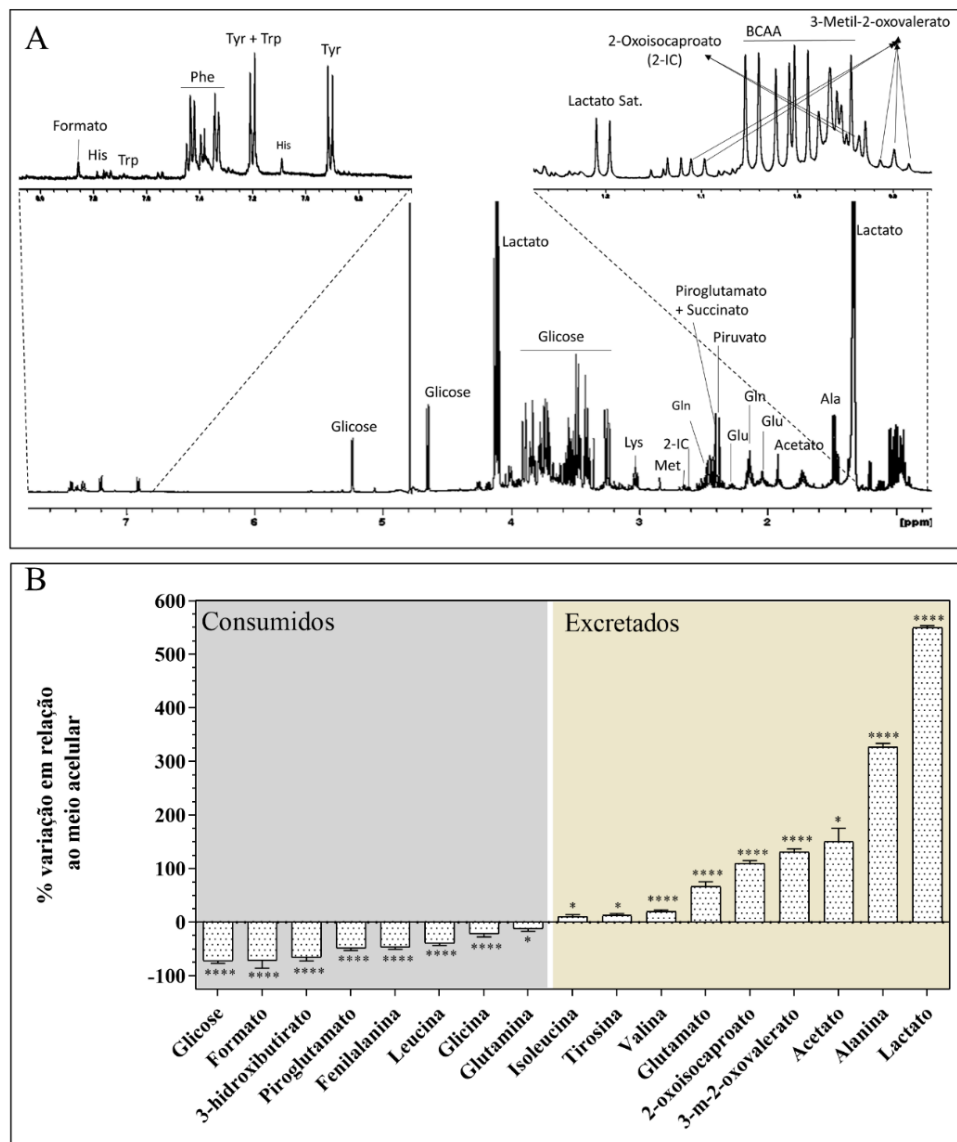
LDC é a que causa maior perturbação na estrutura e dinâmica de membranas modelo (DE PAULA; SCHREIER, 1995; FRACETO et al., 2005). Contudo, no caso das CS, uma menor quantidade de ATC, utilizada no IC50, causou uma perturbação semelhante à das células tratadas com LDC. Para LDC, já existem estudos sobre seu efeito na membrana plasmática e citoesqueleto, como citado anteriormente, contudo não foi encontrado um estudo sobre a causa da perturbação causada pela ATC na membrana plasmática e/ou citoesqueleto, nem comparativo deste efeito com o de outros AL. Burga-Sánchez e col. (BURGA-SÁNCHEZ et al., 2020), utilizando fibroblastos gengivais humanos (células HGF), demonstraram por imunofluorescência que a perda da morfologia celular induzida por ATC se devia a perda do volume citoplasmático e formação de corpos apoptóticos.

### **3.2 Metabolômica**

#### **3.2.1 Análise metabolômica do meio de cultura (exometaboloma)**

Como primeira etapa do estudo metabolômico, o exometaboloma foi analisado, ou seja, o que é consumido e excretado pelas CS. Para isso, o meio DMEM completo, após 24 horas de cultivo, foi extraído e analisado, para comparação com o meio acelular. Na Figura 9A mostra-se um espectro 1D de RMN de <sup>1</sup>H padrão de meio condicionado pelas CS, com alguns metabólitos atribuídos são mostrados na Figura 9A. Também apresentamos uma Tabela (Tabela S1) com a composição do meio DMEM puro, fornecida pelo fabricante.

No espectro do meio condicionado pelas CS, foi possível atribuir 24 metabólitos (Tabela S2), sendo que destes, 17 apresentaram diferença significativa nos seus níveis, em relação ao meio acelular. Os resultados da variação dos metabólitos do meio acelular e do meio com células (controle, sem tratamento) são apresentados na Figura 9B.



**Figura 9.** A, Espectro 1D RMN- $^1\text{H}$  do meio DMEM suplementado controle após 24 horas de cultura de células Schwann e; B, Variação dos metabólitos consumidos e excretados no meio após 24 horas de cultura de células de Schwann sem tratamento (controle). \* p < 0,05; \*\*\*\* p < 0,001.

Dentre as funções já citadas das CS, destaca-se a de sustentação energética dos axônios (BROWN et al., 2012). Assim, seu metabolismo é intrinsicamente ligado ao metabolismo neuronal. No catabolismo, o glicogênio presente nas CS é degradado em glicose e esta é convertida a lactato, que é transportado aos axônios para sua produção de energia (MEDEIROS et al., 2016). Especificamente as CS mostram alta atividade de LDH (enzima responsável pela reação reversível de lactato a piruvato) em comparação a outras células da glia (RUST et al., 1991).

Como se nota pela variação dos metabólitos, a glicose do meio de cultura é consumida pelas CS, apresentando uma diminuição em relação ao meio acelular maior que 50%, confirmando ser este um importante substrato para este tipo celular, assim como beta-

hidroxibutirato, que pode ser utilizado pelas CS para síntese lipídica (CLOUET; BOURRE, 1988; JANA; PAHAN, 2016). Além disso, o metabólito formiato (sal de ácido fórmico), um intermediário normal do metabolismo, também é utilizado como substrato pelas CS, sendo sua diminuição maior que 50% no meio de cultura. Em contrapartida, existe uma alta excreção de lactato (> 500%), alanina (> 300%) e acetato (> 100%) por estas células. Estes três compostos (mais a glicose) podem ser utilizados como fonte de energia pelas células neuronais (JHA; MORRISON, 2018; TSACOPOULOS et al., 1994). Assim, este resultado é compatível com uma célula de suporte energético neuronal. O lactato produzido é transportado (por transportadores de monocarboxilato, MCT) para a célula neuronal e, no sistema nervoso periférico, pode até substituir a glicose como fonte de energia, mantendo a função dos axônios (BALTAN, 2014) ao ser oxidado a piruvato e gerar energia através da respiração aeróbica (MILLER; RICHARDS; KRIEBEL, 2002). Acetato, assim como o lactato, é considerado também um substrato energético utilizado pelo SNP em situações de alta atividade neuronal, ou quando há limitação de glicose e/ou oxigênio (JHA; MORRISON, 2018). Este, após ser transportado, é convertido em acetil-CoA e entra no Ciclo de dos ácidos tricarboxílicos (TCA) formando citrato (WILLIAMS; O'NEILL, 2018). Devido à alta atividade glicolítica da CS, a alanina pode ser produzida a partir de piruvato, por transaminação. Assim, a alanina excretada, quando transportada para os neurônios, além de ser utilizada para produção de glutamato (ERECISKA et al., 2008) pode também ser utilizada como substrato energético (piruvato) (TSACOPOULOS et al., 1994; ZWINGMANN et al., 2000).

Em células gliais é normal a ocorrência de metabolismo de aminoácidos (aa). Em relação aos outros aa que apresentaram variação em relação ao meio acelular, notamos o aparecimento dos dois subprodutos da quebra incompleta de aa de cadeia ramificada (BCAA), a saber, 2-oxoisocaproato e 3-metil-2-oxovaleriato, indicativos de atividade metabólica de aa pelas CS. Além da produção destes compostos, piroglutamato (PiroGlu), fenilalanina (Phe), leucina (Leu), glicina (Gly) e glutamina (Gln) são consumidos pelas CS. O glutamato (Glu) é um aa também produzido pelas CS, com um aumento cerca de 50%. Sendo um aa excitatório, sua liberação pelas CS é relatada na literatura (JEFTINIJA; JEFTINIJA, 1997).

Como uma das funções das CS é a produção de mielina, constituída principalmente (70%) por lipídeos ((FLEDRICH et al., 2018), a síntese de ácidos graxos é importante neste tipo celular (KIDD; OHNO; TRAPP, 2013). Assim é necessária uma alta quantidade de intermediários do CK para que existam níveis de citrato que possam ser destinados à produção de ácidos graxos. Por isso, nestas células, reações anapleróticas são importantes a fim de

sustentar a síntese de ácidos graxos (VIADER et al., 2013) e explicando a homeostasia celular pelo metabolismo de aa.

Em suma, nossos achados com CS são compatíveis com o metabolismo normal células da glia que possuem alta atividade glicolítica e apresentam como função, dar suporte ao metabolismo dos axônios, provendo metabólitos que irão se converter em energia. Além disso, CS são responsáveis pela produção de mielina. Esta, para ser produzida, necessita de ácidos graxos, sintetizados a partir de altas quantidades de citrato, que podem ser mantidas através do metabolismo de aa.

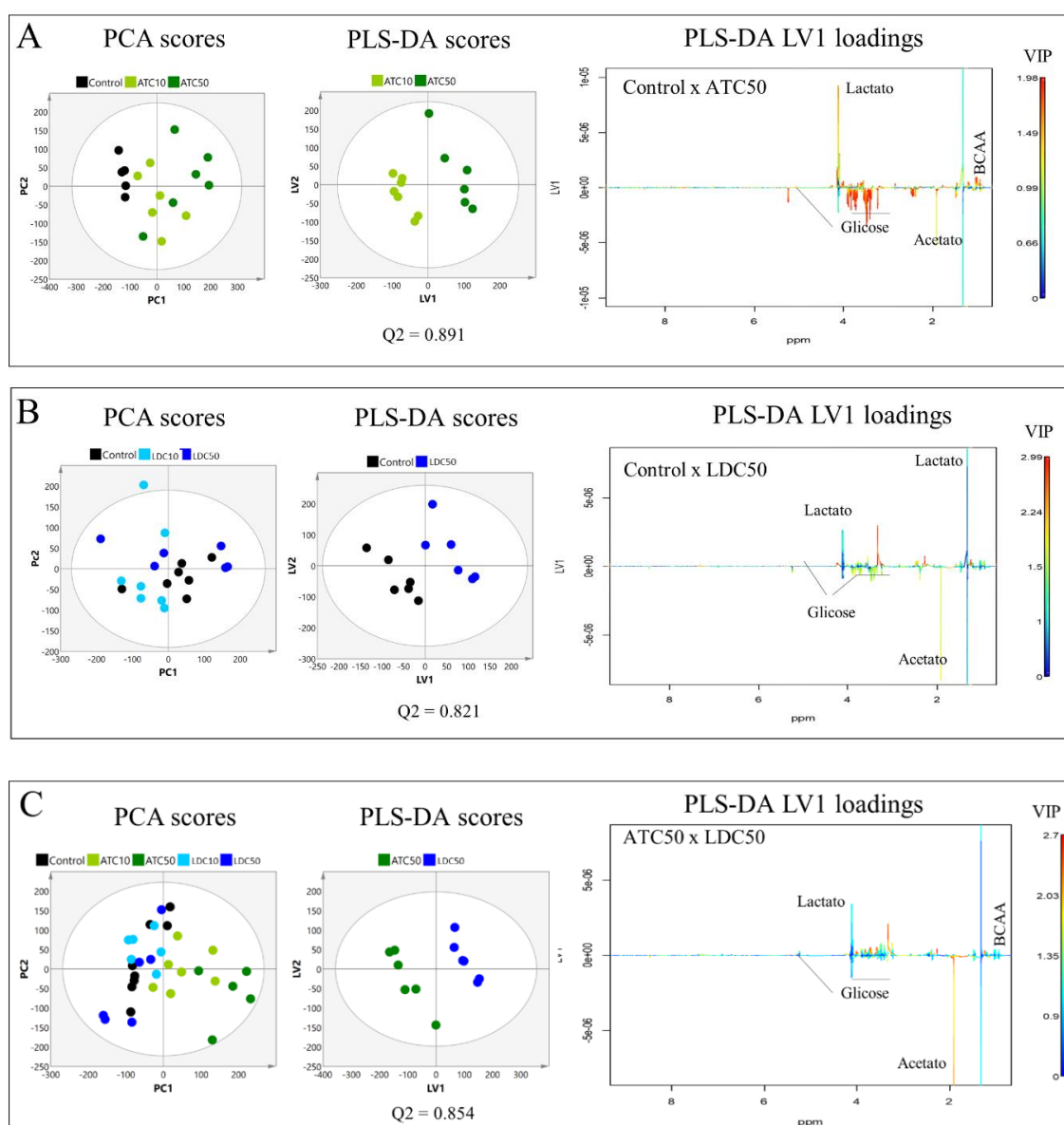
### 3.2.2 Impacto no exometaboloma causado pela exposição das CS aos anestésicos locais

A fim de avaliar as mudanças metabólicas induzidas por ATC e LDC nas CS, os perfis metabólicos dos meios foram primeiramente analisados, através de análise multivariada. Os resultados destas análises são apresentados na Figura 10. Além disso, os espectros dos fármacos, no meio sem células e nos meios celulares após exposição aos AL são apresentados no material suplementar na Figura S1.

A análise multivariada, mostrada na Figura 10A, se refere as amostras expostas a ATC. No gráfico de PCA (esquerda), vê-se uma razoável separação do meio controle em relação a amostras do meio exposto a ATC no IC50; o que é menos evidente no IC10. Tal discriminação das amostras na concentração IC50 é confirmado por PLS-DA (gráfico do meio, Figura 10A) onde se vê um gráfico de scores com clara separação em LV1 entre o grupo controle e o grupo IC50, além de um alto valor de  $Q^2$  (0,89). Ao inspecionar o gráfico de PLS-DA *loadings* (Figura 10A, à direita), que mostra qualitativamente os principais metabólitos responsáveis pela discriminação das amostras, tem-se uma avaliação imediata das principais semelhanças e diferenças entre os efeitos metabólicos produzidos no meio de cultura das células controle e no meio das células expostas a ATC no IC50. Loadings negativos indicam que a glucose é mais intensa nas amostras com scores negativos (ATC10), ou seja, se o meio dessas células tem mais glucose, quer dizer que ela foi menos consumida. Pelo contrário, o lactato mostra-se bastante aumentado no IC50. Acetato mostrou-se diminuído, enquanto os BCAA estão aumentados. Em relação a exposição à LDC, os scores de PCA (Figura 10B esquerda) não mostram uma evidente separação entre as concentrações testadas, em relação ao controle. Porém, na dose de IC50 (LDC50) há maior separação, claramente evidente nos dois grupos distintos na análise de PLS-DA, com  $Q^2$  de 0,821 (Figura 10B centro). No gráfico de PLS-DA *loadings* (direita, Figura

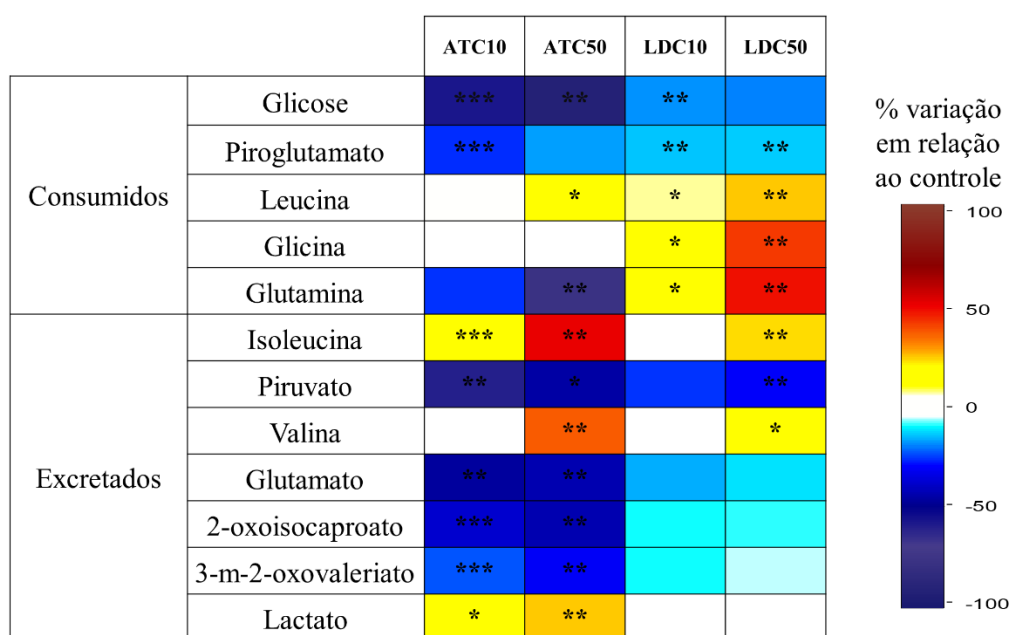
10B) encontramos também uma diminuição da glicose e um aumento do pico de lactato, porém menos intenso que o encontrado com ATC50.

Quando realizada a análise por PCA com todos os grupos (Figura 10C esquerda), não se notou separação evidente entre controle e as amostras LDC10 e LDC50; porém, nas amostras de ATC10 notou-se uma pequena separação e, nas amostras de ATC50 uma evidente separação. Quando analisado por PLS-DA LDC50 vs. ATC50, notou-se uma clara separação ( $Q^2=0,85$ ) destes grupos, sugerindo uma resposta celular diferente frente à exposição aos 2 anestésicos. O gráfico de PLS-DA loadings, confirmou a diferença entre estes dois grupos, principalmente nos metabólitos lactato e glicose.



**Figura 10.** Análises multivariadas dos espectros 1D de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos do meio de cultura de células de Schwann. **A**, Articaína; **B**, Lidocaína e **C**, todos os grupos. Controle (control); Articaína na concentração IC10 (ART10) e IC50 (ATC50); Lidocaína na concentração IC10 (LDC10) e IC50 (LDC50). Escala de importância da Variável na Projeção (VIP).

A magnitude e a significância das diferenças nos metabólitos individuais, em cada concentração de anestésico (comparativamente aos controles) foram avaliadas através da integração espectral 1D, possibilitando uma análise mais detalhada das variações metabólicas. Os resultados foram resumidos em um mapa de calor (Figura 11) com código de cores em função da % de variação em relação aos controles. Somente foram incluídos os metabólitos com magnitude de efeito (“*effect size*”) absoluto maior que 0,8, representativos de efeitos relevantes (BERBEN; SEREIKA; ENGBERG, 2012).



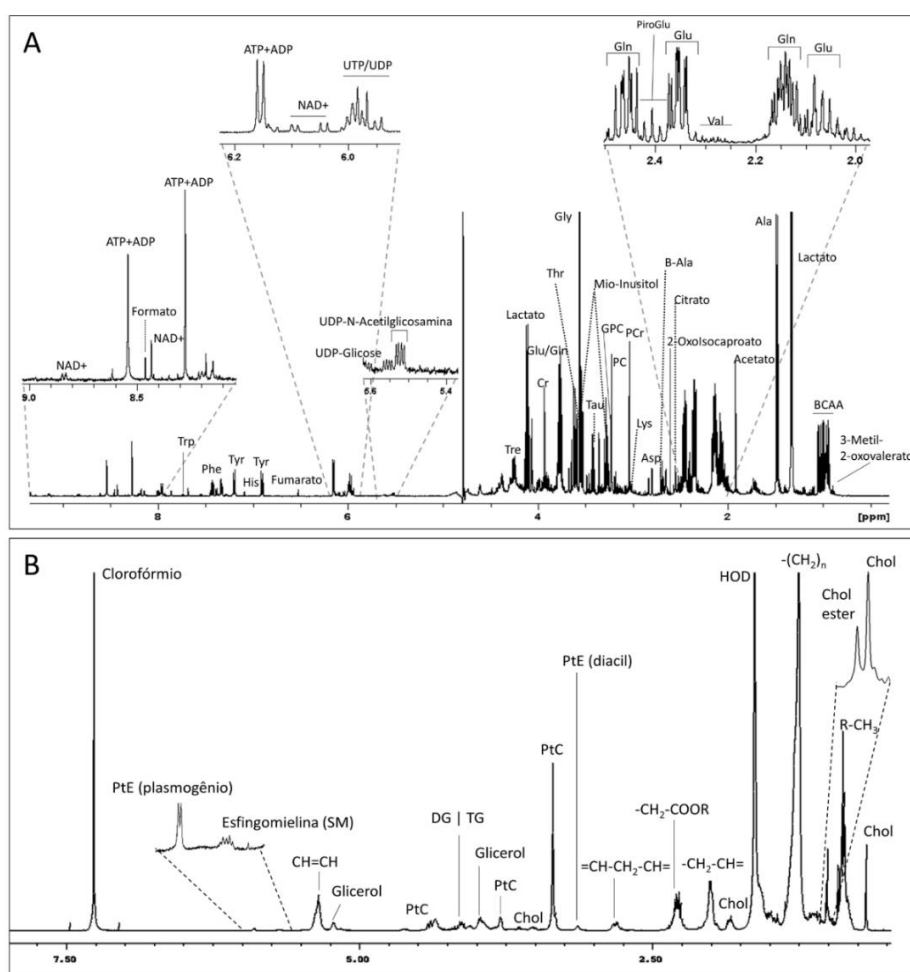
**Figura 11.** Análise univariada das amostras do meio de cultura. Mapa de calor representativo da % de variação em relação ao controle das amostras expostas a articaína no IC10 (ATC10) e IC50 (ATC50) e lidocaína no IC10 (LDC10) e IC50 (LDC50). Teste estatísticos de Mann Whitney. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

À primeira vista, o mapa de calor indica uma variação mais pronunciada nos metabólitos das células tratadas com ATC (ATC10 e ATC50). Especificamente vemos um maior consumo de glicose nas amostras expostas a ATC, onde a variação foi de quase 100%, em relação enquanto nas amostras de LDC houve consumos, menores de 50%, em relação ao meio celular. Assim também o lactato, produzido pela via glicolítica (respiração anaeróbica), foi mais excretado das células expostas à ATC (12 e 24% com ATC10 e ATC50, respectivamente), e praticamente não variou nas CS expostas a LDC. Este parece ser um indício que a ATC induz um aumento do metabolismo anaeróbico. Além disso, o piruvato que antes era excretado, apresentou uma diminuição de excreção em todos os tratamentos, efeito mais pronunciado em ATC10 e ATC50. Interessante notar que os metabólitos referentes a quebra incompleta de BCAA, 2-oxoisocaproato (2-OI) e 3-m-2-oxovaleriato (3-MO), mostraram uma diminuição de

excreção evidente nas amostras tratadas com ATC (23 e 31% para 3-MO; 38 e 55% para 2OI) em relação a LDC (8 e 5% para 3-MO; 6 e 7% para 2-OI); sugerindo uma alteração significativa no metabolismo de aa, nas amostras tratadas com ATC. Também, Glu, Gln e PiroGlu sofreram diminuição nas amostras tratadas com ATC; enquanto ao contrário, nas amostras tratadas com LDC, Gln foi mais consumida (12% com LDC10 e 48% com LDC50). A leucina foi mais consumida em ATC50, LDC10 e LDC50 enquanto a excreção de valina foi diminuída nos tratamentos com ATC50 e LDC50.

### 3.2.3 Análise metabolômica do extrato celular polar e apolar

Em relação ao extrato celular polar, ou extrato aquoso, foram identificados 38 metabólitos, como demonstra o espectro 1D de  $^1\text{H}$  de uma amostra controle atribuído (Figura 12A). Espectros 2D e a Tabela com a atribuição são dadas no material suplementar, Figura S2 e Tabela S3 respectivamente. Da mesma forma, os espectros do extrato celular apolar, com 10 diferentes classes de lipídios, são apresentados nas Figuras 12B (espectro 1D) e S3 (espectros 2D).

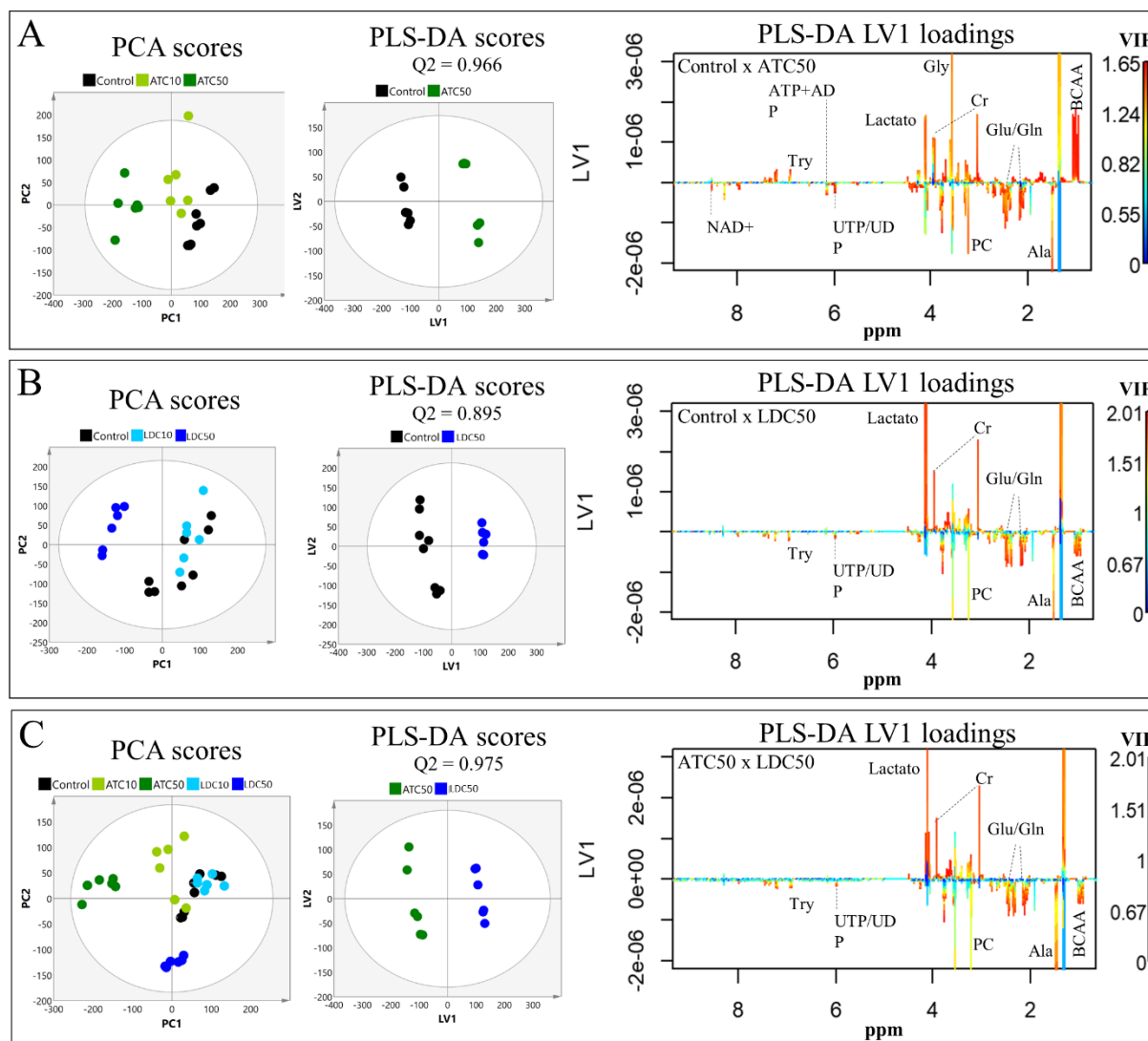


**Figura 12.** Espectro 1D de RMN- $^1\text{H}$  de: **A**, extrato aquoso controle e **B**, extrato lipídico controle.

As diferenças encontradas no extrato aquoso foram analisadas, primeiramente, por análise multivariada e os resultados são apresentados na Figura 13. Em relação a variação dos metabólitos intracelulares solúveis em água das células expostas a ATC vemos, quando aplicado PCA (Figura 13A, esquerda), uma discreta separação entre amostras controle e expostas a ATC no IC10 (ATC10), além de uma separação evidente quando as CS foram expostas a IC50 (ATC50), sugerindo que a ATC afeta o metabolismo intracelular, mesmo na concentração mais baixa. É evidente, quando aplicado PLS-DA, a separação entre o grupo controle e ATC50, com  $Q^2$  igual a 0,96. No gráfico de *loadings* (Figura 13A, direita), vê-se vários metabólitos importantes na discriminação dos grupos, como lactato, glicina, creatina e aa de cadeia ramificada (BCAA) fortemente coloridos positivamente, além de alanina, Glu, Gln, fosfocolina (PC), UTP/UDP, ATP+ADP e  $NAD^+$ , fortemente coloridos negativamente.

Quando as células foram expostas a LDC, a análise por PCA (Figura 13B, esquerda) mostrou que a separação é evidente somente no grupo exposto a maior concentração de LDC (LDC50); neste caso, quando comparado com o controle na análise por PLS-DA, uma forte separação é encontrada ( $Q^2 = 0,895$ ). No gráfico de *loadings* (Figura 13B, direita), vários sinais são assinalados como variáveis importantes na separação, a saber: creatina e lactato (positivamente) e BCAA, Glu, Gln, Ala, PC e UTP/UDP (negativamente).

Para verificar se havia diferenças no efeito desencadeado por cada anestésico no metabolismo, realizou-se a análise PCA com todos os grupos, de forma simultânea (Figura 13C, esquerda). Nesta, é possível visualizar que as amostras expostas a ATC sofrem uma separação já na IC10 (ATC10), que fica evidente na ATC50 e que é diferente da separação observada para LDC na IC50 (LDC50). Esses resultados indicam uma resposta celular diferente frente a exposição a estes dois anestésicos. Além disso, não detectamos diferença entre as células controle e as expostas a LDC em baixa concentração (LDC10). Analisando os grupos ATC50 e LDC50 por PLS-DA (Figura 13C, centro) detectamos clara separação entre estes grupos ( $Q^2=0,975$ ), confirmando o diferente padrão de variação metabólica entre os dois tratamentos, que no gráfico de *loadings* (Figura 13C, direita) aparece como forte coloração (diferença entre os grupos importantes) para os metabólitos BCAA, lactato, alanina, Gln, Glu e Creatina.



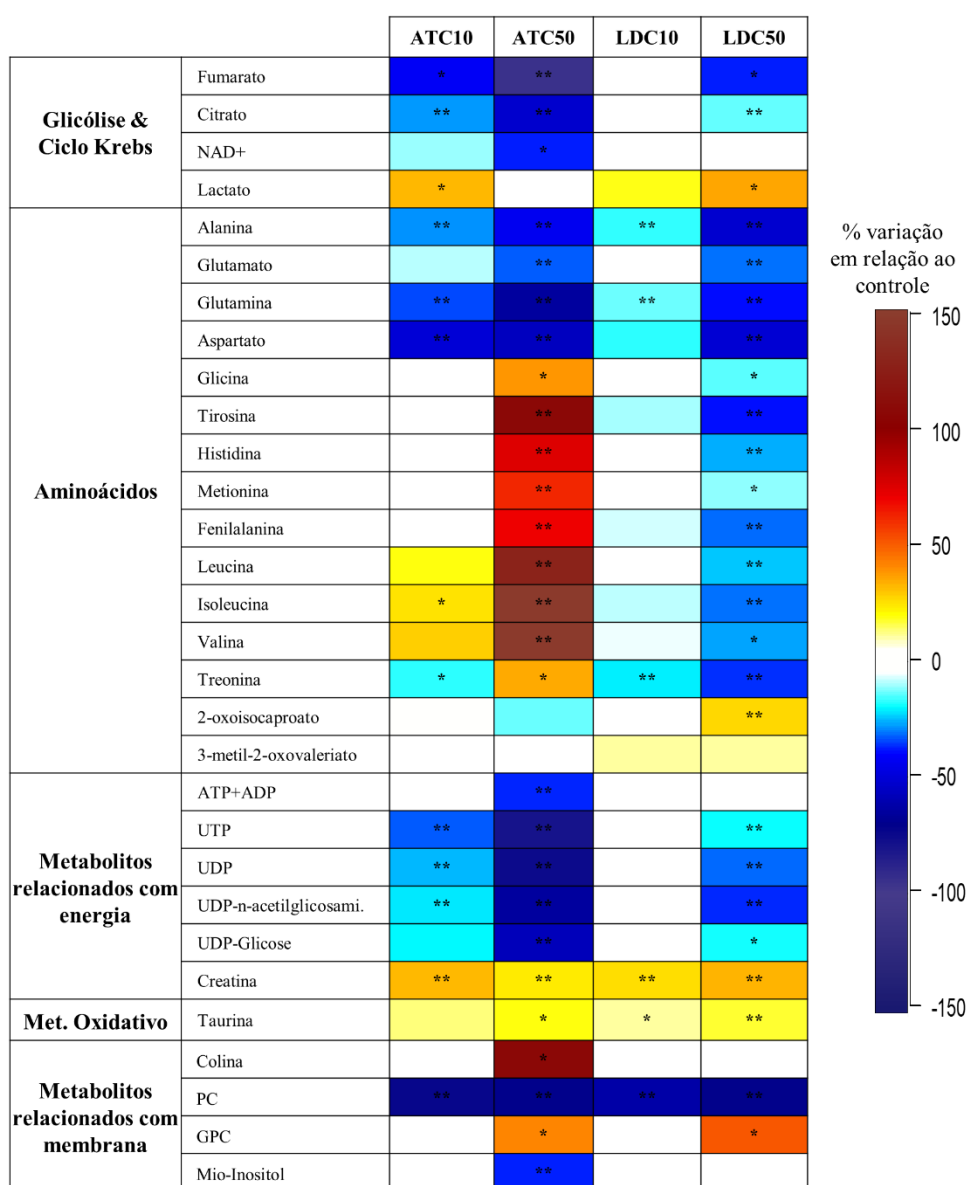
**Figura 13.** Análises multivariadas dos espectros 1D de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos aquosos intracelulares de células de Schwann. **A**, Articaína; **B**, Lidocaína e **C**, todos os grupos. Control, controle; Articaína na concentração IC10 (ATC10) e IC50 (ATC50); Lidocaína na concentração IC10 (LDC10) e IC50 (LDC50). Importância da Variável na Projeção (VIP).

Em relação aos extratos apolares, lipofílicos, a análise multivariada por PCA não houve distinção clara entre o grupo controle e os tratados (Figura S4) sendo, por este motivo, não discutidos aqui. Porém, mostraremos na análise univariada os metabólitos que sofreram variações significativas.

Da mesma forma que nas amostras do meio de cultura, o extrato celular aquoso e o lipídico tiveram seus espectros 1D integrados, permitindo a avaliação de cada metabólito. Os resultados são apresentados nas Figuras 14 e 15, como mapa de calor. Além disso, um resumo com as alterações encontradas é mostrado na Figura 16.

em relação ao controle, as células expostas a concentração menor de ATC (ATC10) apresentaram variação significativa em 19 metabólitos hidrofílicos, a maioria exacerbada na

concentração maior (ATC50), mostrando efeito dose-dependente, em conformidade com o delineamento prático proposto. Esse mesmo efeito (alterações mais pronunciadas na maior concentração), também foi visualizado com o anestésico LDC. Porém, na IC10, as variações metabólicas significativas deram-se apenas em 12 metabólitos. Este dado está de acordo com a análise multivariada, que mostrou menor variação nas amostras tratadas com LDC10, em relação ao controle.



**Figura 14.** Análise univariada do extrato polar. Mapa de calor representativo da % de variação em relação ao controle das amostras expostas a articaína no IC10 (ATC10) e IC50 (ATC50) e lidocaína no IC10 (LDC10) e IC50 (LDC50). Teste estatístico de Mann Whitney. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

Já é de conhecimento que AL provocam alterações na bioenergética celular, afetando principalmente a atividade mitocondrial. Assim, em relação aos metabólitos identificados e

pertencentes à glicólise e TCA, identificamos que na concentração mais baixa de ATC10 já se nota prevalência da via glicolítica, com grande produção de lactato e diminuição dos intermediários do CK: fumarato e citrato. Com LDC na concentração mais baixa (LDC10), houve apenas um pequeno aumento na produção de lactato. Além disso, metabólitos relacionados à produção de energia já estão diminuídos no tratamento com ATC10, como também UDP-glicose, significando que a célula está programada para um maior consumo de glicose. Essas alterações não são vistas com LDC10, a não ser pela formação de creatina, presente na exposição aos dois fármacos, nas duas concentrações estudadas. Na IC50 para a ATC, estão mais pronunciadas todas as alterações provocadas, com diminuição de quase 100% nos intermediários do CK. Se nota, claramente, que a célula já não está conseguindo manter a produção de energia com a falta de lactato e baixa razão ATP/ADP. Já na LDC50, mesmo diminuídas as concentrações de fumarato e citrato, ainda há produção de lactato e a célula ainda manter uma maior razão de ATP/ADP. É de se notar, que nos meios das amostras ATC50 ocorreu o consumo de praticamente toda a glicose disponível, o que não aconteceu com LDC50. A falta de glicose do meio, devido ao alto consumo por exposição à ATC, pode ser o motivo dos resultados encontrados. Estes dados indicam que, na presença de ATC, a célula depende exclusivamente do uso deste metabólito. Ao contrário, na LDC50 ainda há glicose no meio, indicando que LDC promove outras alterações celulares para não depender exclusivamente da glicose do meio e do estoque de glicogênio da CS (Figura 16).

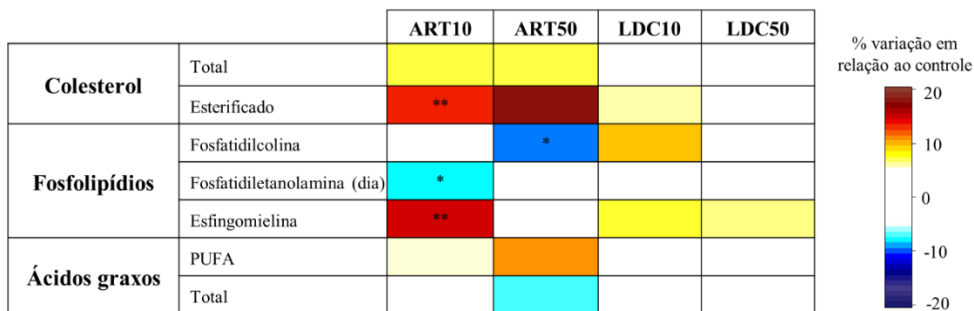
As alterações inversas, nas concentrações de alguns aa (Gly, Tyr, His, Met, Phe, BCAA, Tre e 2-OI) - aumentados em ATC50 e diminuídos em LDC50 - nos indicam que, com a exposição à LDC, aa estão sendo degradados a fim de prover energia. Ou seja, reações anapleróticas devem estar sustentando o metabolismo celular, comum em CS e como já relatados para a LDC (BOONE et al., 2017). A produção de metabólitos 2-OI e 3-MO, provenientes da quebra de BCAA, é indício de um maior uso de aa, pós tratamento com LDC. Interessantemente, ATC não provoca, ou não permite tais alterações celulares, provocando um aumento desses aa, possivelmente não utilizados para homeostasia energética celular.

Taurina, um aa relacionado com a proteção celular ao estresse oxidativo (RIPPS; SHEN, 2012), está aumentado em todos os testes realizados, de forma mais pronunciada quando há maior exposição ao AL. Já é sabido que AL provocam estresse oxidativo (NOUETTE-GAULAIN et al., 2011), tal que o aumento deste metabólito pode confirmar a tentativa celular de conter processos oxidativos promovidos pelos AL.

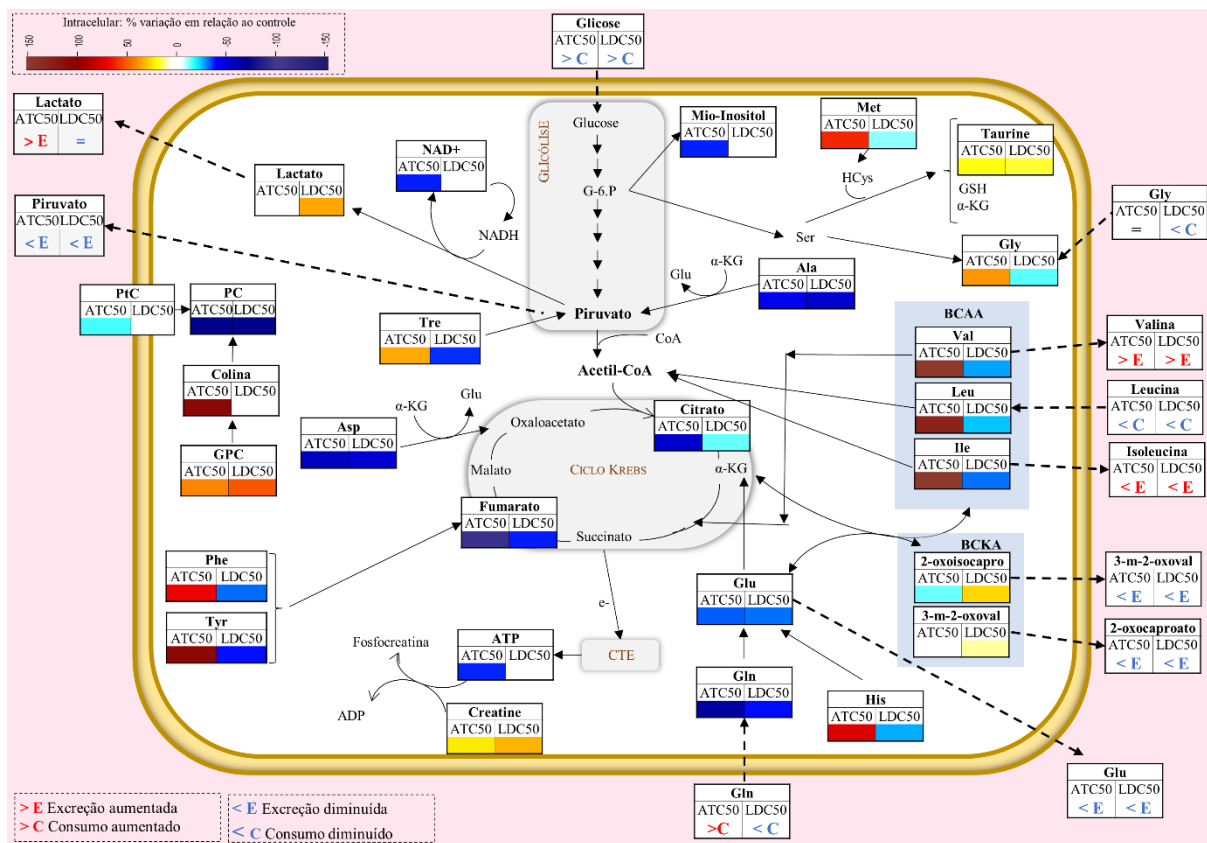
Em relação aos metabólitos aquosos relacionados com a membrana, a colina apresentou um aumento na ATC50. Considerando que este metabólito pode ser fonte de grupos metil para

produção energética, através da sua conversão a betaína e metionina (NELSON; COX, 2006), podemos relacionar este aumento a não utilização de aa pela CS exposta a ATC, conforme já relatado. Níveis maiores de colina podem, ainda, ser um reflexo da degradação de lipídios da membrana plasmática. A glicerofosforilcolina (GPC) é um derivado da colina e uma das duas principais formas de armazenamento da colina (juntamente com a fosfocolina, PC) no citosol. Estes compostos podem também ser usados como substrato energético (LIN et al., 2009). A diminuição de PC em todos os tratamentos (>70%) é indicativo do uso deste como suporte energético. Porém na ATC50 e LDC50 houve um aumento de GPC de quase 50%. Além disso, GPC pode estar relacionada a osmorregulação celular. Desta forma, anestésicos como LDC provocam aumento na concentração intracelular de cálcio (GOLD et al., 1998). Essa desregulação osmótica, acentuada nas maiores concentrações dos AL estudados, poderia ser o motivo do aumento de GPC (KIM; JUNG, 1998). Além disso, o metabólito mio-inositol que também se relaciona com mecanismos de osmorregulação e detoxificação (LAMEGO et al., 2014) está diminuído na ATC50, sugerindo alto estresse oxidativo e desregulação osmótica nas CS após exposição a maiores concentrações de ATC. Além disso, estudos demonstraram que CS regulam vários aspectos da função axonal e uma desrupção no seu metabolismo pode causar o acúmulo de intermediários neurotóxicos que comprometem a função de suporte neural desta célula, desencadeando patologias axonais (GONÇALVES et al., 2017).

Em relação ao extrato celular lipofílico (Figura 15), CS expostas a ATC mostraram as maiores alterações. Os níveis de colesterol total (>5%) e esterificado (>15%) foram alterados nos tratamentos com ATC10 e ATC50. Estes dados são compatíveis com uma depleção na produção de ATP na presença de ATC, pois a produção e esterificação do colesterol estão relacionadas aos níveis de energia celular, em resposta ao funcionamento das vias metabólicas (CHEN et al., 2014; LAY et al., 2001; SKIBA et al., 1996). Assim, o metabolismo predominantemente glicolítico provocado pela ATC, já foi relatado ser o motivo do aumento dos níveis de colesterol *in vitro*, em células de hepatoma (CAMPBELL; CHAN, 2008). Na mesma direção, em astrócitos (células de suporte da glia) depletados de ATP houve aumento de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), como observado neste estudo, após tratamento com ATC (>5%) (Figura 10) (SUN; FLEMING; TAYLOR, 1993). Outro dado interessante é o aumento da produção de esfingomielina na ATC10 (>15%) e nas células tratadas com LDC em IC10 e IC50 (>5%), sugerindo uma resposta celular de estresse, com maior produção de componentes da bainha mielina pelas CS.



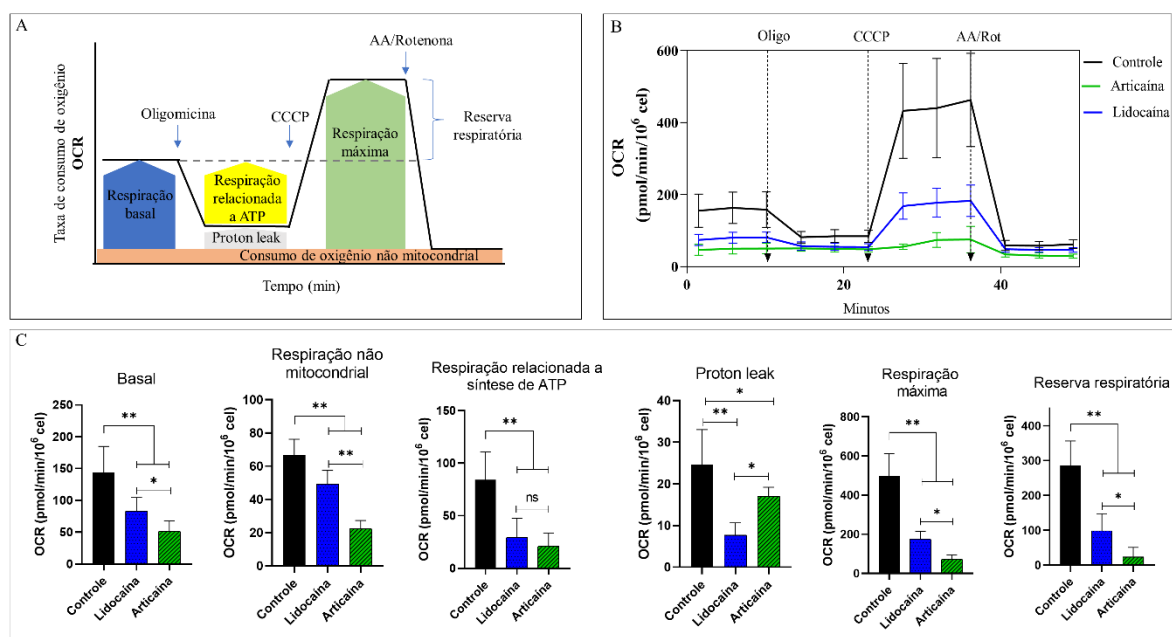
**Figura 15.** Resultados da análise univariada do extrato apolar. Mapa de calor representativo da % de variação em relação ao controle das amostras expostas a articaína no IC10 (ATC10) e IC50 (ATC50) e lidocaína no IC10 (LDC10) e IC50 (LDC50). Teste estatístico de Mann Whitney. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ . PUFA, ácidos graxos poli-insaturados.



**Figura 16.** Resumo das alterações metabólicas encontradas nas células de Schwann frente a exposição aos anestésicos locais articaína (ATC) e lidocaína (LDC). Códigos de três letras são usados para identificar os aminoácidos; BCCA, aminoácidos de cadeia ramificada (Val, Leu, Ile); BCKA, cetoácidos de cadeia ramificada (2-oxoisocaproato e 3-metil-2-oxovalerato); CTE, cadeia de transporte de elétrons; GPC, glicerofosfocolina;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -cetoglutarato; NAD, nicotinamida adenina dinucleotídeo; PC, fosfocolina; PtC, fosfatidilcolina.

### 3.3 Medidas das taxas de consumo de oxigênio e de acidificação extracelular

A taxa de consumo de oxigênio (OCR) é utilizada como um parâmetro indicador da função mitocondrial, já que o consumo de oxigênio está diretamente relacionado à síntese de ATP e à captação de elétrons dos metabólitos (DIVAKARUNI et al., 2014). O experimento de OCR consiste na adição de vários reagentes que causam estresse mitocondrial como a oligomicina (inibidor da ATP sintase), cianeto de carbonil 3-clorofenilhidrazona (CCCP, desacoplador mitocondrial) e, por último, antimicina A e rotenona (inibidores do complexo III e I, respectivamente). Após cada adição é medida a variação da OCR e um gráfico é construído mostrando a variação da OCR de acordo com o reagente adicionado (Figura 17A) e em função do tempo da medida. A partir destes dados é possível acessar diversos parâmetros mitocondriais específicos como: OCR basal, OCR convertida em ATP, capacidade respiratória mitocondrial máxima, respiração relacionada ao vazamento de prótons mitocondrial (*proton leak*), reserva respiratória e consumo de oxigênio não relacionado à mitocôndria.



**Figura 17. Resultados da determinação da taxa de consumo de oxigênio (OCR).** A, Esquema representativo de uma análise padrão de OCR. B, Resultados da curva de OCR das células de Schwann controle e das expostas a articaína e lidocaína por 24 horas no IC10. C, Gráficos representativos dos parâmetros mitocondriais acessados através do experimento de OCR de células de Schwann, controle e tratadas com articaína ou lidocaína por 24 horas no IC10. Oligomicina (Oligo), cianeto de carbonil 3-clorofenilhidrazona (CCCP), antimicina A (AA), rotenona (Rot). Estatística: ANOVA com pós teste T de Tukey: ns, não-significativo; \* p<0,05; \*\* p<0,01.

Os resultados da curva de OCR em CS expostas a ATC ou LDC (na concentração mais baixa, de IC10) são mostrados na Figura 17B e o resultado individualizado de cada parâmetro medido é dado na Figura 17C. Na curva, enquanto as células controle mostram variações consistentes com a adição dos agentes estressantes, a exposição aos AL causa uma diminuição

da resposta celular em toda a curva, especialmente nas CS tratadas com ATC. Ao analisarmos a respiração basal celular vemos que ATC causa uma diminuição desta em ~65% e a LDC em ~40%, ambos significativos ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle e entre si. Além disso, parte desta respiração basal está relacionada ao consumo de oxigênio por reações celulares não mitocondriais e, neste parâmetro, vemos que as células tratadas com ATC sofrem uma diminuição do consumo de oxigênio basal de 66%, enquanto a CS tratadas com LDC de 26%.

Assim, a diferença entre a respiração basal das CS expostas a ATC em relação a LDC é de 32 pmol/min/ $10^6$  cel e a diferença da OCR para reações não mitocondriais entre os AL é de 27 pmol/min/ $10^6$  cel. Estes dados mostram que a diferença na respiração basal entre os AL está relacionada as reações que consomem oxigênio não mitocondriais, que podem estar comprometidas nas células tratadas com ATC. Uma das enzimas relevantes, que pode influenciar na taxa de consumo de oxigênio não mitocondrial é a NADPH oxidase. A NADPH oxidase é uma enzima ligada à membrana citoplasmática e responsável pelo consumo de oxigênio e produção de  $H_2O_2$  (LADDHA; KULKARNI, 2020), ou seja uma enzima ligada a espécies reativas de oxigênio (ROS). Esta enzima tem sido estudada em CS pois pode causar alterações em suas funções normais levando a neurotoxicidade (EID et al., 2022; IMPELLIZZERI et al., 2011; MEDA et al., 2016). Assim, a NADPH oxidase é um interessante alvo de investigação para entender mecanismos relacionados à neurotoxicidade da ATC e LDC e sua diferenciação.

O dados relativos ao consumo de oxigênio relacionado a produção de ATP (Fig. 17C) mostram que as CS expostas aos AL diminuíram sua taxa de consumo destinada a produção de ATP em 75 % (ATC) e 65% (LDC). Ou seja, a produção de ATP está comprometida. Apesar do maior comprometimento na presença de ATC, a diferença não mostrou significância estatística com a LDC. Como já estudado, AL causam disfunção mitocondrial dose-dependente em diversas linhagens celulares (GONG et al., 2018; JOHNSON et al., 2004; WERDEHAUSEN et al., 2007; ZHUANG et al., 2015). Assim, os resultados encontrados em CS confirmam este efeito dos AL na respiração celular, tal que a célula deve estar se reprogramando para a produção de ATP pela via não aeróbica.

Em relação ao OCR relacionado ao vazamento de prótons (*proton leak*), encontramos que nas CS, a ATC diminuiu o vazamento em 31% e a LDC em 69%. Interessantemente, em células de polpas dentais expostas a ATC ou LDC a 2,0 mM por 16 horas, houve um aumento da OCR relacionado ao vazamento de prótons (ZHUANG et al., 2015).

A capacidade respiratória máxima (Fig. 17C) reflete a habilidade celular em responder a alta demanda de produção energética e é interessante para estudar o efeito de fármacos no

metabolismo celular (DIVAKARUNI et al., 2014). Neste caso, vemos uma diferença significativa entre os AL estudados. Enquanto ATC diminui a capacidade respiratória máxima das CS em 86%, LDC diminui em 65%. Assim, CS expostas a ATC possuem menor capacidade de produção de ATP. Em células de polpas dentais, a diminuição da respiração máxima foi similar para os anestésicos ATC e LDC (ZHUANG et al., 2015), resultado contrário aos observados em CS. Assim, em CS, este dado parece indicar que a capacidade respiratória das CS expostas a ATC é menor que a da LDC, abrindo um campo para aprofundamento de pesquisas em relação ao efeito da ATC.

Os dados encontrados nos experimentos de OCR com um todo parecem corroborar os de metabolômica (em que CS expostas a ATC exibiram maiores alterações celulares, com menor controle do metabolismo energético). Assim, os dados de OCR parecem indicar que a função mitocondrial está menos afetada nas células expostas a LDC e que elas mantêm uma capacidade maior de produção de ATP, em relação a ATC. Não há outros estudos com ATC em CS para confrontarmos nossos resultados. Assim, evidencia-se a necessidade de estudos mais detalhados com este tipo celular (já que a função mitocondrial é específica para linhagem) para identificar/compreender a diferença dos efeitos causados pelos AL estudados neste trabalho.

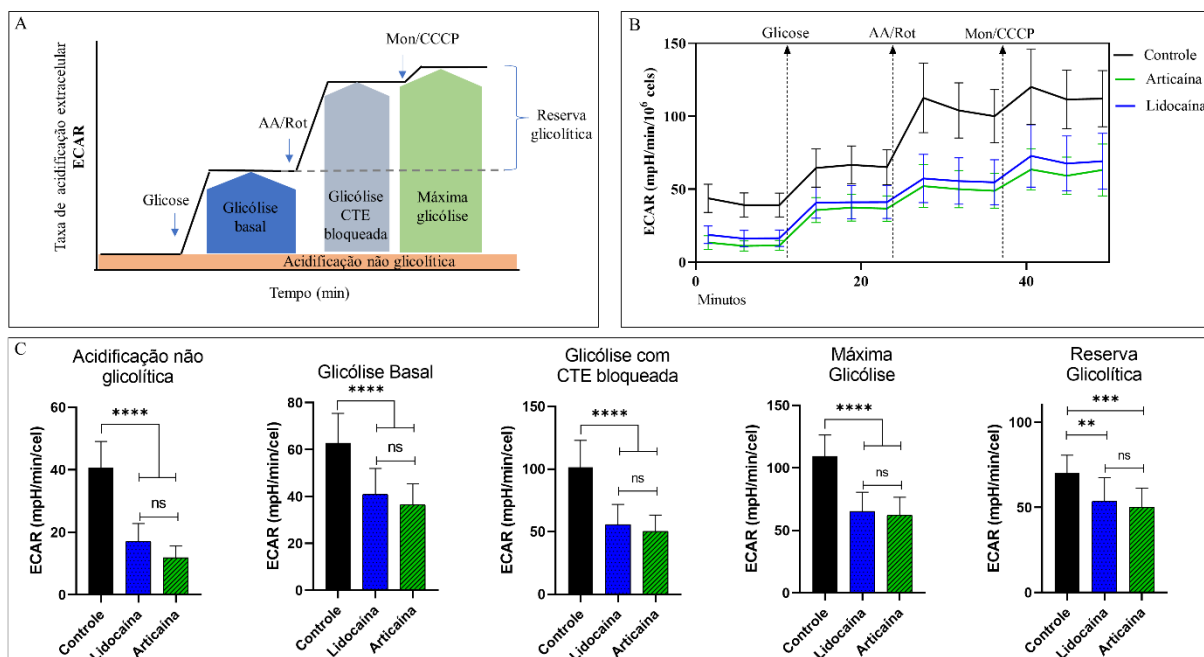
A medida da taxa de acidificação extracelular (ECAR), é realizada através da medição da variação do pH extracelular e pode ser considerada um parâmetro indireto da produção de prótons intracelulares (DIVAKARUNI et al., 2014). Assim, esta medida pode ser correlacionada com a capacidade glicolítica da célula, já que o consumo de glicose celular para produção de ATP gera produtos ácidos (lactato ou bicarbonato) que são excretados com prótons para o meio extracelular. Entretanto, na via glicolítica ambas as formas de produção de prótons são possíveis através da metabolização da glicose a lactato ou por fosforilação oxidativa. Assim, apesar da maior contribuição da via anaeróbica na glicólise para produção de prótons ( $1 \text{ H}^+/\text{ATP}$ ), há uma fração representada pela respiração aeróbica ( $\sim 0,18 \text{ H}^+/\text{ATP}$ ) (DIVAKARUNI et al., 2014).

Os resultados obtidos da análise de ECAR (Figura 18) das CS mostram que não há diferença estatística significativa entre as células tratadas com ATC ou LDC nos parâmetros analisados. Contudo, é notado em todos os parâmetros que, em relação aos controles, a exposição das CS aos AL promove uma diminuição da ECAR. Na privação de glicose (determinação da acidificação não glicolítica) vemos uma diminuição na ECAR de 70% para ATC e 60% para LDC, contudo sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre esses tratamentos. Assim, este parece ser um indicativo de uma menor atividade metabólica celular, que poderia

estar relacionada ao dano mitocondrial causado pelos AL. Contudo, com a adição de glicose (determinação da glicólise basal) vemos que há um aumento da ECAR, em relação ao seu respectivo ECAR basal de 50% para as células controle, de 207% para as células tratadas com ATC e de 140% para as células tratadas com LDC. Assim, em uma CS normal, com mitocôndria funcional, a ECAR produzida pela adição de glicose produz menor quantidade de prótons, possivelmente pela produção de energia via fosforilação oxidativa, aeróbica. Porém, nas células tratadas com os AL, com a mitocôndria afetada, há um aumento muito mais pronunciado de ECAR em relação a sua condição basal, sugerindo que a atividade glicolítica não aeróbica pode estar sendo preferida para produção de ATP. Além disso, as células tratadas com ATC mostraram uma elevação maior na ECAR em relação a LDC. Esses dados estão de acordo com os resultados de metabolômica que indicam uma sustentação energética provocada especialmente pela glicólise nas CS tratadas com ATC.

Enquanto o bloqueio da Cadeia de Transporte de Elétrons (CTE) promove um aumento da ECAR de 60% nas CS controle em relação ao seu nível basal, as CS expostas a ATC e LDC sofrem um aumento de 37% na ECAR, em relação aos seus respectivos níveis basais. Assim, possivelmente, devido ao dano mitocondrial causado pelos AL, as CS não conseguem aumentar muito sua taxa glicolítica. Na mesma linha, o desacoplamento da CTE a fim de atingir a glicólise máxima não sofre alteração significativa nas células tratadas com AL, indicando que a célula já está usando o máximo de sua capacidade glicolítica para a produção de energia, devido ao dano causado pelos AL na fosforilação oxidativa.

Assim, os testes de ECAR demonstraram, a princípio, que a via glicolítica está se comportando de maneira semelhante nas células tratadas com AL. Porém, parece que a taxa de ECAR está afetada nestas células, pela falta de respiração aeróbica, provavelmente devido ao dano mitocondrial provocado pelos AL e evidenciados nas análises de OCR (Fig. 17). Além disso, a taxa de ECAR é maior na glicólise basal nas células tratadas com ATC. Assim, de maneira geral, estes dados corroboram os resultados encontrados no estudo metabolômico.

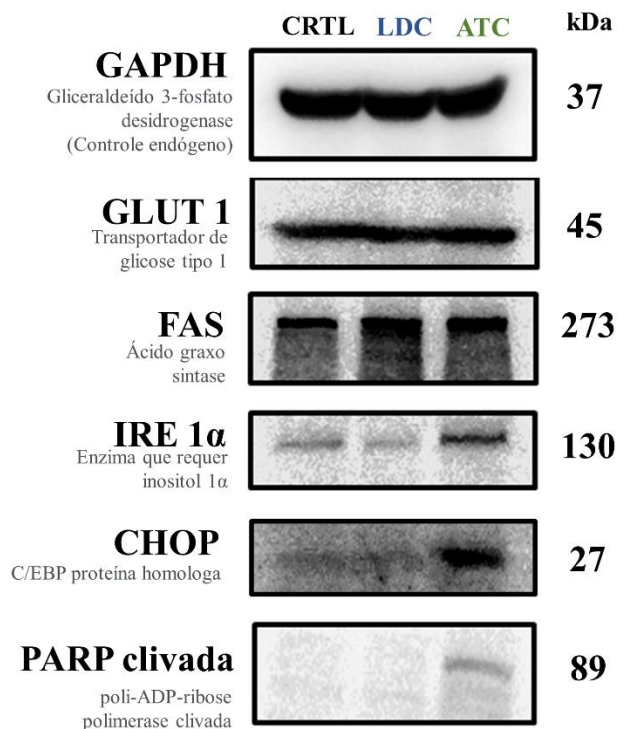


**Figure 18. Resultados da determinação da taxa de acidificação extracelular (ECAR).** A, Esquema representativo de uma análise padrão de ECAR. B, Resultados da curva de ECAR das células de Schwann controle e das expostas a articaina e lidocaína por 24 horas no IC10. C, Gráficos representativos de cada parâmetro glicolítico acessado através do experimento de ECAR em células de Schwann, controle e tratadas com articaina e lidocaína por 24 horas no IC10. Oligomicina (Oligo), cianeto de carbonil 3-clorofenilhidrazona (CCCP), antimiocina A (AA), rotenona (Rot) e monenzina (Mon). Estatística: ANOVA com teste T de Tukey: ns, não-significativo; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,005; \*\*\*\* p<0,001.

### 3.4 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

A fim e aprofundar análises relativas aos resultados do estudo metabolômico foi realizada a análise da expressão de algumas proteínas selecionadas, por Western Blotting. Ressaltamos que estes resultados são preliminares e mais testes ainda serão conduzidos, visando publicação científica deste trabalho.

A primeira via analisada, foi a glicolítica. Relativa a ela, verificamos a expressão do transportador de glicose tipo 1 (GLUT 1) e da enzima-chave gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) que participa da sexta reação da glicólise e que também foi utilizada como controle endógeno. Os resultados são mostrados na Figura 19. Nos ensaios de exometabolômica identificamos um maior consumo de glicose pelas CS tratadas com ATC em relação à LDC; contudo não houve alteração significativa na expressão do GLUT 1 entre os grupos analisados, em relação ao controle. Da mesma maneira, a expressão de GAPDH não mostrou diferença entre os grupos. Assim, a diferença encontrada da maior ativação da via glicolítica nos experimentos anteriores parece estar relacionada à maior necessidade de uso da glicose pelas CS tratadas com ATC, como discutido anteriormente.



**Figura 19.** Resultados dos testes de expressão proteica, por Western Blotting.

Uma segunda alteração evidente na metabolômica (Figura 15) foi que as CS tratadas com ATC mostraram alterações do conteúdo lipídico, principalmente no IC10. Além disso, foi notada uma menor atividade do CK, na presença dos AL. Assim, analisamos, inicialmente, a expressão da enzima ácido graxo sintase (FAS), responsável pela síntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA. Vemos na Figura 19 que a expressão desta está aumentada no grupo tratado com ATC e LDC, com aparente maior expressão no grupo tratado com LDC. Os resultados de metabolômica não revelaram alterações no conteúdo de ácidos graxos totais nos tratamentos com os AL. Contudo, os ácidos graxos poliinsaturados no grupo tratado com ATC se mostraram aumentados. Apesar da maior expressão de FAS, parece não estar havendo aumento da síntese de ácidos graxos, provavelmente devido ao desbalanço energético gerado pelos AL. Assim, pretendemos ainda analisar a via de degradação de ácidos graxos, a fim de elucidar os distúrbios relacionados ao metabolismo dos mesmos.

Um outro achado evidente na análise metabolômica foi a diferença entre o conteúdo de alguns aa das células tratadas com ATC em relação à LDC, associada a menor produção de ATP nas células expostas a ATC. Nestas, alguns aa se mostraram em concentrações superiores, enquanto com LDC, em quantidades diminuídas. Como já proposto, parece que a LDC ative reações anapleróticas, conseguindo manter um melhor balanço energético celular em relação às células tratadas com ATC. Além disso, decidimos verificar se o aumento do teor de

aminoácidos com ATC pode estar relacionado ao estresse de retículo endoplasmático (RE) que poderia induzir degradação proteica. Além das funções de montagem e enovelamento proteico, ou maturação proteica o RE é responsável por outras funções celulares como a estocagem de cálcio e a síntese lipídica (YANG et al., 2021). Assim, um estresse de RE pode ser resultado de uma provação de nutrientes, acúmulo de ROS e outras injúrias celulares ativando vias para restauração da homeostasia celular ou programando o destino final celular (YANG et al., 2021). Uma enzima considerada marcador de estresse de RE é a que requer inositol  $1\alpha$  (IRE  $1\alpha$ ). Assim, maior expressão de IRE  $1\alpha$  indica que no RE há um aumento da concentração de proteínas desnoveladas, característico de estresse de retículo (CHEN; BRANDIZZI, 2013). Um dos motivos do comprometimento do enovelamento proteico está relacionado à geração prejudicada de ATP (CLARKE et al., 2014). Além disso, verificamos que a proteína homóloga C/EBP (CHOP), uma enzima diretamente relacionada ao estresse de retículo (HU et al., 2019), também está mais expressa no grupo tratado com ATC.

O resultado encontrado no Western Blotting mostra claramente que no grupo tratado com ATC há uma maior expressão da IRE  $1\alpha$  e CHOP (Figura 19). Uma outra função dessas proteínas é serem sensores e executores do destino celular (CHEN; BRANDIZZI, 2013). Neste sentido o estresse de retículo está associado a indução de apoptose celular (FAITOVA et al., 2006). A enzima poli-ADP-ribose polimerase (PARP) é um marcador de apoptose. PARP está envolvida no processo de reparo de DNA e é clivada em células em apoptose, durante a degradação de DNA, impedindo seu reparo (MULLEN, 2004). O resultado da expressão de PARP clivada (Figura 19D) mostra que há um aumento significativo de sua expressão no grupo tratado com ATC, evidenciando a programação da sinalização celular das CS expostas a ATC para apoptose.

#### **4. CONCLUSÃO DA PARTE 1**

Nesta parte da tese estudamos o efeito dos anestésicos ATC e LDC em células de Schwann, a fim de compreender os mecanismos envolvidos com a neurotoxicidade destes AL. Resultados de metabolômica por RMN identificaram alterações celulares diversas nas CS tratadas com ATC ou LDC. Foram notadas alterações na via glicolítica, principalmente nas CS tratadas com ATC, além de alterações na concentração intracelular de vários aa: aumentados nas CS expostas a ATC e diminuídos naquelas tratadas com LDC. A partir destes resultados, foram feitas medidas da taxa de consumo de oxigênio celular que identificaram uma maior interferência das funções mitocondriais quando as CS foram tratadas com ATC. Contudo,

resultados de taxa de acidificação extracelular não revelaram diferença significativa entre os tratamentos com os dois AL. Assim, os dados de metabolômica, OCR e ECAR evidenciaram que CS tratadas com ATC se tornam menos eficientes em manter seu balanço energético. Os dados de expressão gênica corroboraram tais achados, pois enzimas relacionadas ao metabolismo da glicose não sofreram alterações após ambos os tratamentos, porém houve estresse de retículo - compatível com dificuldade da CS exposta a ATC em produzir a ATP - e indução da morte celular, via apoptose.

Por fim, do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que revela diferenças moleculares no processo de neurotoxicidade da ATC em relação a LDC. Assim, abrem-se novas possibilidades de pesquisa visando o entendimento das alterações moleculares causadas pela exposição à ATC, sua correlação com a dose clínica utilizada e os relatos de casos de parestesia, frequentemente associados a este AL.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS PARTE 1**

Além das CS, outro tipo celular foi estudado nesta tese: células de origem neuronal SH-SY5Y. Estas células, derivadas de neuroblastoma, expressam diversas características de uma célula neuronal. Os resultados deste estudo foram publicadas e podem ser visualizadas no artigo: “Comparative Metabolomics Study of the Impact of Articaine and Lidocaine on the Metabolism of SH-SY5Y Neuronal Cells; *Metabolites* 2022, 12(7), 581; <https://doi.org/10.3390/metabo12070581>”.

Nesta linhagem, ATC e LDC induziram respostas celulares muito similares, exceto no metabolismo lipídico, no qual a exposição à LDC causou maiores alterações. É importante ter em mente que esta linhagem é derivada de um tipo de tumor, cujo metabolismo pode ser diferente de uma célula neuronal normal e das CS. Contudo, é interessante notar que a neurotoxicidade dos AL pode estar associada ao tipo celular da glia analisado. Sendo assim, entendemos que a utilização de toxicometabolômica para identificação e classificação da neurotoxicidade dos AL é uma ferramenta promissora que pode trazer avanços no conhecimento e na utilização clínica, principalmente da ATC.

## **IV. PARTE 2**

### **Desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados com articaína para aumento da potência anestésica em tecidos inflamados**

#### **1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

Dentre os sistemas de entrega de fármacos (DDS, *drug delivery systems*) constituídos por lipídios (emulsões, lipossomas, etc) no começo dos anos 90 foram descritas as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Diferentemente das emulsões, constituídas por um lipídio líquido na temperatura ambiente e estabilizadas por surfactante, as SLN são constituídas por lipídio sólido na temperatura ambiente ou corporal (KECK; SPECHT; BRÜSSLER, 2021). Com o passar dos anos algumas limitações das SLN ficaram evidentes, tais como a expulsão do fármaco durante o armazenamento e a limitada eficiência de encapsulação, dependente da solubilidade do ativo no lipídio sólido (FREITAS; MÜLLER, 1998). Neste contexto foi desenvolvida uma segunda geração de nanopartículas lipídicas, os carregadores lipídicos nanoestruturados (NLC, *nanostructured lipid carriers*) cujo interior é formado por uma mistura de lipídios líquido e sólido (KECK; SPECHT; BRÜSSLER, 2021; PUGLIA et al., 2011), também estabilizada por surfactantes. O lipídio líquido aumenta a solubilidade dos ativos no “core” lipídico dos NLC, aumentando a eficiência de encapsulação e impedindo a expulsão do fármaco devido a redução da cristalinidade da matriz lipídica (IZZA et al., 2022; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Os NLC são excelentes carreadores de AL, podendo prolongar o tempo de anestesia, conforme relatado para diversos agentes, principalmente quando administrado por via tópica (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019; PUGLIA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2016, 2017; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017). Outra vantagem desse sistema é que os AL podem ser encapsulados no interior lipídico dos NLC na sua forma neutra (sem carga), de maior solubilidade em lipídios. Deste modo, NLC contendo AL, ao contrário das formas comerciais de AL injetáveis (pH < 6) podem ser preparadas com pH acima de 7 (RODRIGUES DA SILVA et al., 2017, 2020a), favorecendo a potência anestésica.

##### **1.1 Excipientes Funcionais**

Para se produzir uma formulação de NLC é possível utilizar uma vasta gama de excipientes lipídicos, de origem sintética ou natural (PUGLIA et al., 2019). Excipientes funcionais são assim chamados porque, além de exercerem sua função estrutural, fornecem aos DDS propriedades adicionais desejáveis. Eles são, normalmente, de origem vegetal ou animal.

Os óleos vegetais, por exemplo, têm sido largamente utilizados como promotores de absorção de antimicrobianos, apresentando atividade anti-inflamatória, antineoplásica e analgésica, dentre outras (SHINDE, RAJSHREE L.; JINDAL, ANIL B.; DEVARAJAN, 2011). Nesta tese, testamos a utilização, da manteiga de abacate, do óleo de oliva e do óleo de copaíba, como excipientes funcionais com possíveis propriedades anti-inflamatórias. As nanopartículas desenvolvidas com excipientes funcionais foram comparadas com NLC preparados com lipídios sintéticos. Uma breve descrição de cada excipiente funcional utilizado é fornecida a seguir.

O abacate é o fruto de uma árvore originada nas Américas, principalmente no México e América Central. Possui em sua composição, além de alta quantidade de ácidos graxos monoinsaturados, esteróis, tocoferóis e carotenoides (MOOZ et al., 2012). Vários dos componentes presentes neste fruto (como a persenona A e B e ácidos graxos insaturados) possuem atividade anti-inflamatória (GABAY et al., 2008; KIM et al., 2000a, 2000b; ROSENBLAT et al., 2011; TARABALLI et al., 2014).

O óleo de oliva provém da extração feita da azeitona, fruto das oliveiras (*Olea europaea*) (WARDHANA; SURACHMANTO; DATAU, 2011). É um produto utilizado desde a antiguidade, com diversas finalidades. Seu uso medicinal aponta para sua ação anti-inflamatória, devido a presença de ácidos graxos insaturados (BAYLAC; RACINE, 2003; CÁRDENO; SÁNCHEZ-HIDALGO; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, 2013; LUCAS; RUSSELL; KEAST, 2011; WARDHANA; SURACHMANTO; DATAU, 2011). Além disso, foi comprovado que o composto oleocantal, presente no óleo de oliva, apresenta propriedades anti-inflamatórias similares ao ibuprofeno (BEAUCHAMP et al., 2005). Cabe citar que o óleo de oliva já foi empregado como componente de NLC, tendo apresentado baixa citotoxicidade (HOW; RASEDEE; ABBASALIPOURKABIR, 2013).

Aprovado pela FDA em 1972 para fins alimentícios, o óleo de copaíba (OC) possui propriedades analgésica, antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (GOMES et al., 2007; VEIGA et al., 2007). Extraído de várias espécies de árvores (*Copaifera L.*) nativas da América latina e principalmente do Brasil, OC é caracterizado pela presença de sesquiterpenos e ácidos diterpênicos (LEANDRO et al., 2012). Gomes e col. relataram em ratos a atividade analgésica avaliada pelo teste de *tail flick*, e a atividade anti-inflamatória, medida através dos testes de diminuição do edema de pata e contorção abdominal, do óleo de copaíba (GOMES et al., 2010).

Assim, nesta parte da tese, mostramos a encapsulação da ATC em NLC contendo excipientes sintéticos e funcionais (manteiga de abacate, óleo de oliva e óleo de copaíba). Como o foco deste trabalho foi o desenvolvimento de uma formulação inovadora para aumentar a

potência anestésica em tecidos inflamados, os excipientes funcionais foram selecionados a fim de trazer propriedades sinérgicas às do AL, para atuar na falha anestésica em tecidos inflamados, um problema ainda sem solução eficaz na clínica odontológica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Cloridrato de ATC (ATC) foi doado pela DFL Ind. Com. S.A. (Rio de Janeiro, Brasil) e a partir deste preparou-se sua forma neutra como previamente descrito (MELO et al., 2017). Palmitato de Cetila (CP) e Dhaykol® 6040 LW (DK) (triglicerídeos caprílico/ácido capríco) foram adquiridos da Dhaymers Química Fina (São Paulo, Brasil). Pluronic® F68 (P68), Tween® 80 (T80), óleo de copaíba (OC) (*Copaiba balsam oil*, CAS 8001-61-4), metilcelulose, metanossulfonato de 3-aminobenzoato de etila (Tricaína), DMEM, soro fetal bovino e  $\lambda$ -carragenina foram fornecidos pela Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Manteiga de abacate (MA) e óleo de oliva (OO) foram adquiridos da empresa Engenharia das Essências Ltda (São Paulo, Brasil). Liss Rhodamine PE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- (lissamina rodamina B sulfonil)) foi adquirido à Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, EUA). A agarose de baixo ponto de fusão foi obtida na Cleaver Scientific Ltd (Warwickshire, Reino Unido). O meio E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM; MgCl<sub>2</sub> 0,3 mM, calibrado para pH 7 com NaHCO<sub>3</sub>) foi preparado no laboratório de Imunologia de Peixes da Universidade Andres Bello. Água desionizada (18  $\Omega$ ) foi obtida com um purificador de água ultra-puro Elga USF Maxima.

### 2.2 Quantificação de articaína por CLAE e verificação da metodologia analítica

A ATC foi quantificada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), de acordo com as condições descritas na Tabela 3. As condições adotadas na metodologia analítica para quantificação foram adaptadas de (AL-MAHALAWY et al., 2018). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Waters, modelo Breeze 2 (Waters Technol., MA, EUA).

**Tabela 3:** Condições cromatográficas para quantificação de articaína.

| Parâmetros          | Condições                                                       |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Coluna              | C18 Gemini-NX 5 $\mu$ 150 x 4.60 mm                             |
| Temperatura forno   | 40°C                                                            |
| Fase móvel          | Acetonitrila:KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM, 25:75 (v/v) |
| Fluxo               | 1 mL.min <sup>-1</sup>                                          |
| Volume de injeção   | 30 $\mu$ L                                                      |
| Comprimento de onda | 273 nm                                                          |

Para a verificação do método analítico avaliou-se os seguintes parâmetros: limites de quantificação e detecção e linearidade. A linearidade do método foi determinada com intuito de demonstrar que os resultados obtidos eram proporcionais à concentração do analito na amostra, no intervalo especificado. Cinco concentrações distintas, realizadas em triplicata e em três dias consecutivos, foram utilizadas para construção da curva analítica sendo o cálculo de regressão linear feito pelo método dos mínimos quadrados (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados utilizando-se as Equações 1 e 2, respectivamente, onde DP é o desvio padrão (intercepto com o eixo y) e IC é a inclinação da curva analítica média.

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

LD refere-se à menor quantidade do analito que pode ser detectado em uma amostra, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, pode-se mensurar o limite de detecção. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra a ser determinada com precisão e exatidão admissíveis sob as condições experimentais já determinadas.

### 2.3 Preparo dos NLC

O preparo foi feito pelo método da emulsificação-ultrasonicação (SCHWARZ et al., 1994). Ambas as fases, lipídica e aquosa, foram aquecidas em banho-maria até 10 °C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido: 67 °C para formulações com palmitato de cetila (ponto de fusão = 57 °C) e 65 °C para aquelas preparadas com manteiga de abacate (ponto de fusão = 55 °C). Logo após, a ATC na forma básica foi incorporada à fase lipídica e mantida sob agitação magnética até completa solubilização do fármaco na fase oleosa. Para a formação da pré-emulsão, a fase aquosa foi adicionada, gota-a-gota, à fase lipídica, sob agitação de 10000 rpm por 3 min, utilizando-se um ultra agitador (Ultra-turrax T18, IKA WerkeStaufen, Alemanha). A pré-emulsão formada foi imediatamente submetida à sonicação de ponta. Nesse processo, a pré-emulsão sofreu agitação ultrassônica com uma microponta de titânio no equipamento

Vibracell (Sonics & Mat. Inc., Danbury, USA), na potência de 50W e 20 kHz de frequência nominal, em ciclos de 30 segundos (ligado/desligado) durante 10 min. Ao término desta etapa, a nanoemulsão formada foi arrefecida em banho de gelo, até 25 °C a fim de solidificar as nanopartículas formadas originando a formulação NLC-ATC. Formulações controle, sem articaína, foram também preparadas.

## **2.4 Planejamento experimental**

As 6 formulações de NLC-ATC selecionadas através dos testes empíricos (necessários para encontrar misturas lipídicas estáveis), foram delineadas experimentalmente. 3 variáveis independentes (fatores): concentração total lipídica (TL), concentração de ATC e concentração do tensoativo foram analisadas em dois diferentes níveis, contando com o ponto central em triplicata. As variáveis dependentes escolhidas (respostas) foram: tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta. O preparo das formulações foi realizado de maneira randômica e os dados foram tratados com o software Design Expert 11 (Stat-Ease Inc., MN, EUA).

## **2.5 Caracterização físico-química dos NLC**

### *2.5.1 Medida de Tamanho e índice de polidispersão*

O tamanho médio das partículas e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz dinâmico, DLS (*dynamic light scattering*) no aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido). As medidas foram realizadas em triplicata, diluindo-se 1000 vezes a dispersão de nanopartículas em água desionizada, à temperatura de 25 °C, em cubetas de poliestireno (10 mm de caminho óptico). Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

### *2.5.2 Medida do Potencial Zeta*

O potencial Zeta (PZ) foi determinado por microeletroforese Doppler a laser, utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido). Nessa técnica um campo elétrico é aplicado a uma dispersão de partículas que passam a se mover com velocidade relacionada ao seu potencial elétrico de superfície (LOWRY et al., 2016). Essa velocidade é medida por uma técnica interferométrica a laser, chamada M3 PAL (espalhamento de luz com análise de fases). Com ela, é possível calcular a mobilidade eletroforética e, a partir desta, inferir o potencial Zeta das partículas e sua distribuição. As medidas de PZ foram feitas em triplicata,

após diluição (1000x) das suspensões de NLC com água desionizada, em cubetas apropriadas, de poliestireno, à temperatura de 25 °C. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

### 2.5.3 Medida do número de partículas

O número de partículas por mL das formulações de NLC foi determinado a partir de sua diluição (100000x) e medidos no equipamento de análise por rastreamento NS300 NTA (NanoSight, Amesbury, UK) equipado com um laser ver1 de, a 532 nm.

### 2.5.4 Determinação de articaína nos NLC

Para avaliação do teor de ATC nas formulações, retirou-se 50  $\mu$ L da amostra, dissolveu-se em 1950  $\mu$ L de fase móvel e colocou-se em banho ultrassônico por 20 minutos, seguido de centrifugação a 4100x g, por 20 min. Dos sobrenadantes obtidos coletou-se alíquotas de 200  $\mu$ L, que diluídas em 1800  $\mu$ L de fase móvel foram analisadas por CLAE, segundo o método descrito (item 2.2).

### 2.5.5 Eficiência de encapsulação e capacidade de carregamento

A eficiência de encapsulação de ATC pelas formulações de NLC foi determinada pelo método de ultrafiltração-centrifugação (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Alíquotas de 0,4 mL da amostra foram transferidas para uma unidade de filtração com poros de 10 kDa (Millex, Millipore) acoplada a tubos Eppendorf e centrifugadas por 20 min a 4100x g. A solução filtrada foi coletada e os AL livres foram quantificados por CLAE, de acordo com o método validado (item 2.2). A porcentagem de eficiência de encapsulação (% EE) do anestésico foi calculada, conforme a Equação 3.

$$\%EE = \frac{ATC\ total - ATC\ livre}{ATC\ total} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: ATC total corresponde à quantidade total de articaína quantificada na suspensão de NLC e ATC livre (não encapsulada) corresponde à ATC quantificada no filtrado da ultrafiltração-centrifugação.

A quantidade de ATC carregada nos NLC foi também expressa em termos de capacidade de carregamento, %DL (*Drug loading*) e calculada de acordo com a Equação 4 (CHEN et al., 2015):

$$\% \text{ carregamento} = \frac{\text{massa de ATC encapsulada}}{\text{massa da nanopartícula}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

### 2.5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) as formulações de NLC (10  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas a uma grade de microscopia eletrônica (Cu, 300 mesh; Koch LTDA, SP). Após 2 min, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de acetato de uranila a 2% (p/p), para contraste negativo. Após 1 min, o excesso de volume foi removido e 10  $\mu\text{L}$  de água desionizada foram adicionados à amostra. A grade preparada permaneceu em repouso por 24 h, em temperatura ambiente, para secagem. As micrografias eletrônicas foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 Zeiss (Carl Zeiss, Alemanha), operando a 60 kV.

### 2.5.7 Medidas de Calorimetria Diferencial de Varredura e Difração de Raios X

Os termogramas de DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) foram obtidos em um Calorímetro Diferencial de Varredura Modelo 2910 (TA Instruments), em porta-amostra padrão de alumínio selado e analisadas no programa Thermal Solutions v.1.25 (TA Instruments, EUA). As amostras foram liofilizadas antes da realização das análises. A taxa de aquecimento foi de 10  $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ , entre 20 e 150  $^{\circ}\text{C}$ .

As análises de Difração de Raios-X (XDR) foram realizadas com as amostras liofilizadas, em um difratômetro Shimadzu XRD7000 (Quioto, Japão), utilizando-se uma fonte de Cu-K $\alpha$  e corrida de 2  $^{\circ}$ /min entre valores de  $2\theta$  de 5 e 50 $^{\circ}$ .

## 2.6 Estabilidade física

As formulações de NLC, foram avaliadas por acompanhamento dos seguintes parâmetros: tamanho de partícula, PDI e PZ em intervalos de tempo pré-determinados durante 12 meses à temperatura ambiente (25  $^{\circ}\text{C}$ ).

## 2.7 Teste de liberação *in vitro*

A liberação *in vitro* foi estudada utilizando um sistema de células de difusão do tipo Franz de 12 mL, com tampão PBS 5 mM (pH 7,4, 37  $^{\circ}\text{C}$ ), separado da amostra por uma membrana de celulose (membrana de diálise Spectra/Por<sup>®</sup>, MWCO 12-14 kDa) (n = 6). Foram adicionadas 50  $\mu\text{L}$  das amostras no compartimento doador. Em intervalos de tempo (15 min, 30 min e depois em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 24 horas) amostras de 200  $\mu\text{L}$  foram coletadas da porta coletora do compartimento acceptor e substituídas por tampão, para manter a condição *sink*. A ATC presente nas amostras retiradas do compartimento acceptor foi quantificada por CLAE. O software KinetDS 3.0 foi utilizado para a análise quantitativa das curvas de liberação obtidas

(MENDYK et al., 2012). Vários modelos cinéticos foram testados e, de acordo com o coeficiente  $R^2$ , o modelo de Weibull (Equação 5) apresentou o melhor ajuste para todas as formulações NLC (PAPADOPOULOU et al., 2006).

$$m = 1 - \exp \left[ \frac{-t^n}{a} \right] \quad \text{Equação 5}$$

Onde, “m” é a quantidade de ATC liberada em função do tempo (t), e “a” denota um parâmetro de escala que descreve a dependência de tempo e “n” caracteriza a curva obtida.

## 2.8 Estudo *in vitro* da viabilidade celular

Células da linhagem RSC96 (células neuronais de Schwann de *Rattus norvegicus* de imortalização espontânea; ATCC® CRL-2765) foram cultivadas em meio DMEM e suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100 UI.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg.mL<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina). As células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas a 37 °C sob atmosfera úmida com 5 % de CO<sub>2</sub> por 48 horas, até atingirem a semi-confluência. Todos os experimentos foram realizados com células entre as passagens 6 a 12.

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizado o método de MTT (MOSMANN, 1983), já descrito nesta tese (item 2.2 da parte 1). Os resultados obtidos foram expressos em % de viabilidade celular em relação ao controle e tratados com o software GraphPad Prism® 6.0.

## 2.9 Testes *in vivo* utilizando peixe-zebra

### 2.9.1 Linhagens e manutenção

Os protocolos experimentais e de manutenção do peixe-zebra foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Andrés Bello, de Santiago/Chile (Certificado 007/2016). As linhagens Tg (BACmpx:GFP)<sup>i114</sup> (RENSHAW et al., 2006) e TgBAC (cldn15la:GFP)<sup>pd1034</sup> (ALVERS et al., 2014) foram utilizadas. Os peixes foram mantidos e criados de acordo com protocolos-padrão (RICH; KONSTANTINIDIS; DELONG, 2008). Todos os embriões foram coletados por meio de desova natural e criados a 28 °C em placas de Petri contendo meio E3, de acordo com (KIMMEL et al., 1995). Todas os experimentos foram realizados com larvas de 5 dias pós-fertilização (dpf).

### 2.9.2 Absorção das NLC pelas larvas

Oito larvas TgBAC (cldn15la:GFP)<sup>pd1034</sup>, foram incubadas em meio E3 com os NLC desenvolvidas (10<sup>10</sup> nanopartículas.mL<sup>-1</sup>) preparados com 0,01% m/m de rodamina PE. Após

a incubação, as larvas foram anestesiadas com 0,017% de triclaína e montadas em lâminas com 4% de metilcelulose ou 1% de agarose de baixo ponto de fusão, para serem analisadas sob um estereomicroscópio de fluorescência ou um microscópio confocal, usando os filtros RFP (fluorescência vermelha) e GFP (fluorescência verde).

### 2.9.3 Atividade anti-inflamatória dos excipientes das NLC

Oito larvas Tg (BACmpx: GFP)<sup>i114</sup> foram selecionadas com quantidade semelhante de neutrófilos no tecido hematopoiético caudal e menos de 5 neutrófilos na região do somito (ZUÑIGA-TRASLAVIÑA et al., 2017). As larvas selecionadas foram incubadas em meio E3 livre ou contendo formulações de NLC ( $10^{12}$  nanopartículas.mL<sup>-1</sup>), sem ATC, por 1 hora. Após incubação as larvas foram lavadas, anestesiadas com triclaína 0,017% e a nadadeira caudal foi amputada com bisturi microcirúrgico (World Precision Instruments, UK) para induzir um processo inflamatório agudo, conforme descrito por (ELKS; LOYNES; RENSCHAW, 2011). 3 horas após o dano (hpd), quando o número máximo de neutrófilos estava presente na lesão, foi quantificada sua quantidade na área danificada.

### 2.9.4 Bradicardia e tempo de recuperação da bradicardia

Oito larvas Tg (BACmpx:GFP)<sup>i114</sup> foram incubadas em meio E3, com ATC livre (0,5 e 1 mM), NLC-ATC (0,5 ou 1,0 mM) ou NLC controle ( $10^{12}$  nanopartículas.mL<sup>-1</sup>), por 1 hora. Em seguida, os batimentos cardíacos das larvas foram quantificados por 60 segundos sob um estereomicroscópio. Para recuperação da bradicardia, as larvas foram tratadas nas mesmas condições acima por 1 hora, a solução foi lavada e os batimentos cardíacos foram quantificados em 1, 2 e 3 horas após a remoção (hpr) do tratamento.

### 2.9.5 Efeito anestésico: reação ao toque

Oito larvas Tg (BACmpx:GFP)<sup>i114</sup> foram incubadas em meio E3 com ATC livre (0,5 e 1 mM), NLC-ATC (0,5 ou 1,0 mM) ou NLC controle ( $10^{12}$  nanopartículas.mL<sup>-1</sup>), por 1 hora. Após a incubação, um estímulo mecânico foi executado, tocando-se a cabeça das larvas com uma agulha romba. A natação rápida foi classificada como 100% ou resposta normal; uma natação claramente mais lenta que o normal foi registrada como 50% e 0% foi atribuído quando nenhum movimento foi observado (larvas anestesiadas).

### 2.9.6 Estatísticas e imagens dos testes com peixe-zebra

As imagens fluorescentes foram capturadas em um estereomicroscópio Leica M205 com lâmpada de haleto de metal (duas objetivas - 0,63x e 1,0x, zoom motorizado com faixa de ampliação de 7,8 - 160x), câmera DFC 7000T e software Leica Applications Suite X, v. 3.3

(Leica Microsystems, Alemanha), ou ainda em um microscópio confocal a laser Leica SP8 (óleo HPL APO CS2 40×, abertura numérica de 1,30 e distância de trabalho da lente objetiva = 0,24 mm). Para edição de imagem, foi usado o software ImageJ 1.52a (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Para todos os experimentos, três repetições foram executadas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA com post-hoc teste de Tukey. Para todos os resultados, o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo e o software GraphPad Prism, versão 6.01 (Califórnia, EUA) foi usado. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

## 2.10 Testes *in vivo* em modelos murino

### 2.10.1 Condições de manutenção dos animais

Ratos Wistar machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*) com 200- 250 g foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEMIB/UNICAMP). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da UNICAMP (Protocolos 4832-1/18 e 5852-1/21), que segue as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Os ratos foram alojados em grupos de 4 indivíduos, sob ciclos claro/escuro de 12/12 horas. Todos os procedimentos com animais foram conduzidos de acordo com as regras estabelecidas pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor).

### 2.10.2 Modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina

Os ratos ( $n = 6$ ) receberam uma única injeção intraplantar de carragenina (100  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ /pata). O limiar nociceptivo mecânico foi medido pelo método eletrônico de von Frey em condições basais (antes da estimulação inflamatória) e nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a aplicação da carragenina. As amostras: solução salina, ATC a 0,1 e 0,5%, NLC-ATC a 0,1 e 0,5% e NLC controle, sem ATC ( $\pm 1,6 \times 10^{13}$  nanopartículas.  $\text{mL}^{-1}$ , equivalente a 0,5% NLC-ATC) foram injetadas por via intraplantar ,170 minutos após a injeção de carragenina.

### 2.10.3 Modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por prostaglandina E2

Para este estudo, os ratos foram separados em 5 grupos de 5 animais cada de forma randômica e o limiar nociceptivo mecânico foi medido pelo método eletrônico de von Frey (descrito abaixo) antes da aplicação de qualquer tratamento (limiar basal). Poda o estudo, dois pesquisadores foram envolvidos. O primeiro foi responsável pela aclimação dos animais e administração dos tratamentos e o segundo foi responsável pelas medidas do limiar nociceptivo, sendo que este não tinha conhecimento de qual tratamento tinha sido realizado.

Após medição do limiar basal, cada animal recebeu uma única injeção intraplantar de prostaglandina E2 (PGE2) na concentração de 100 ng/50 µL/pata para a indução da dor inflamatória. Após 170 min da aplicação da PGE2 (pico da dor), os animais receberam o tratamento conforme tabela 1. Apenas o grupo o grupo tratado com naloxona (20 µg/pata), para o bloqueio dos receptores opioides, recebeu a dose 120 min após a aplicação de PGE2.

**Tabela 1.** Grupos, tamanho amostral (n) e tratamento realizados.

| Grupos | n | Tratamento                                                              |
|--------|---|-------------------------------------------------------------------------|
| 1      | 5 | NLC-OC2-A 0,5%                                                          |
| 2      | 5 | Naive – sem tratamento (controle)                                       |
| 3      | 5 | Articaína livre 0,5%                                                    |
| 4      | 5 | Naloxona + NLC-OC2 $1,6 \times 10^{13}$ nanopartículas.mL <sup>-1</sup> |
| 5      | 5 | NLC-OC $1,6 \times 10^{13}$ nanopartículas.mL <sup>-1</sup>             |
| 6      | 5 | NLC-CP2-A 0,5%                                                          |
| 7      | 5 | Solução salina (controle positivo)                                      |
| 8      | 5 | NLC-CP2 $1,6 \times 10^{13}$ nanopartículas.mL <sup>-1</sup>            |

#### 2.10.4 Teste eletrônico de von Frey

O limiar nociceptivo mecânico foi medido pelo método eletrônico de von Frey (VIVANCOS et al., 2004). Previamente, os ratos passaram por uma adaptação em uma sala silenciosa e foram colocados em gaiolas acrílicas (12 × 20 × 17 cm) com piso de arame. Para aclimatação, os animais foram mantidos nas gaiolas por 15 a 30 minutos antes do teste. Um espelho inclinado colocado sob a grade foi usado para fornecer uma visão clara da pata traseira de rato. O teste consistiu na indução do reflexo de flexão da pata traseira usando-se uma ponta de polipropileno (0,7 mm<sup>2</sup>) conectada ao transdutor de força portátil (Electronic Analgesimeter, Insight®, Brasil). O investigador foi treinado para aplicar a ponta na região central da pata, entre as cinco almofadas distais e a aumentar gradualmente a pressão. O estímulo foi interrompido automaticamente quando o rato mostrou o reflexo de retirada da pata. Nesse ponto, a intensidade da força (gramas) foi registrada. Três estímulos foram aplicados na mesma pata, para obter a média de resposta. Os dados foram expressos pela variação do limiar mecânico ( $\Delta$ , em gramas), que foi calculado subtraindo-se a média das três medidas após o tratamento, da média das medidas antes do tratamento.

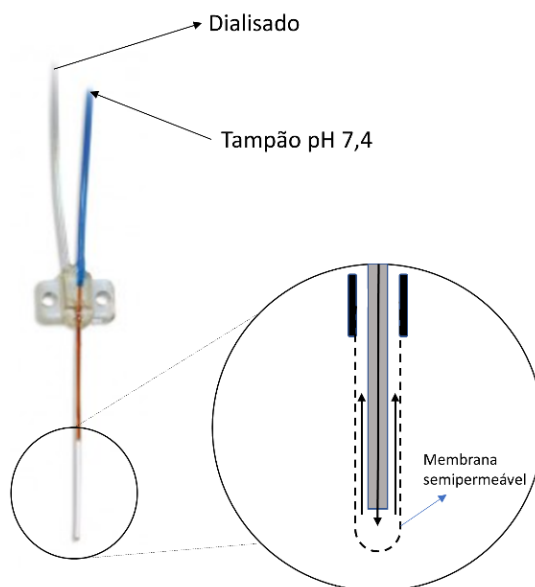
#### 2.11 Estudo farmacocinético (microdiálise local em tecido inflamado)

A análise de farmacocinética da ATC nas formulações desenvolvidas foi realizada utilizando-se o método de microdiálise tecidual (JOUKHADAR; MÜLLER, 2012; UNGERSTEDT, 1991). Para isso, foram utilizadas sondas CMA 20 (CMA Microdialysis,

Kista, Suíça). Um esquema de uma sonda de microdiálise é mostrado na Figura 20. Previamente, as sondas foram calibradas *in vitro*, assegurando que a % de recuperação da sonda (diálise) e a % de perda (retrodiálise) fossem iguais para ATC (dados não mostrados). O fluxo utilizado foi de 1,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , mantido por um infusor PHD22/2000 (Harvard Apparatus, MA, USA) com seringas de 1 mL. O líquido de perfusão utilizado foi tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4. O mesmo método analítico descrito anteriormente foi utilizado para quantificação da ATC.

Para a coleta das amostras, os ratos ( $n = 5$ ) foram previamente anestesiados com uretano (1000 mg/kg). Em seguida, eles receberam uma única injeção intraplantar de carragenina (100  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}/\text{pata}$ ). Após 2 horas, as sondas foram inseridas na pata do animal. Na terceira hora após a injeção de carragenina, as formulações contendo 0,5% de ATC em solução ou encapsulada em NLC foram injetadas (50  $\mu\text{L}/\text{pata}$ ). Após 3 min, iniciou-se a coleta do dialisado em intervalos de 10 minutos, com posterior quantificação por CLAE. No fim de cada experimento, a solução tampão foi trocada para uma solução de ATC a 5  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  e a sonda foi estabilizada por uma hora para posterior coleta e cálculo da % de perda da sonda no tecido (retrodiálise).

A concentração obtida em cada tempo foi calculada e normalizada em relação a % de recuperação da sonda e expressa em escala logarítmica em função do tempo, utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.01 (Califórnia, EUA). Após, foram calculados os seguintes parâmetros farmacocinéticos: 1) Constante de eliminação, ou  $k_e$ , (fração de fármaco eliminada por tempo, calculada a partir da inclinação da reta do gráfico logaritmo da concentração de ATC em função do tempo); 2) Meia vida tecidual ( $t_{1/2}$ ), que é o tempo necessário para reduzir a concentração do fármaco pela metade, no tecido ( $t_{1/2} = 0,693/k_e$ ); 3) Área sob a curva do gráfico do logaritmo da concentração de ATC em função do tempo e 4) Concentração inicial tecidual. Cada parâmetro foi estatisticamente avaliado, utilizando-se o teste t de Tukey no software GraphPad Prism, versão 6.01 (Califórnia, EUA).

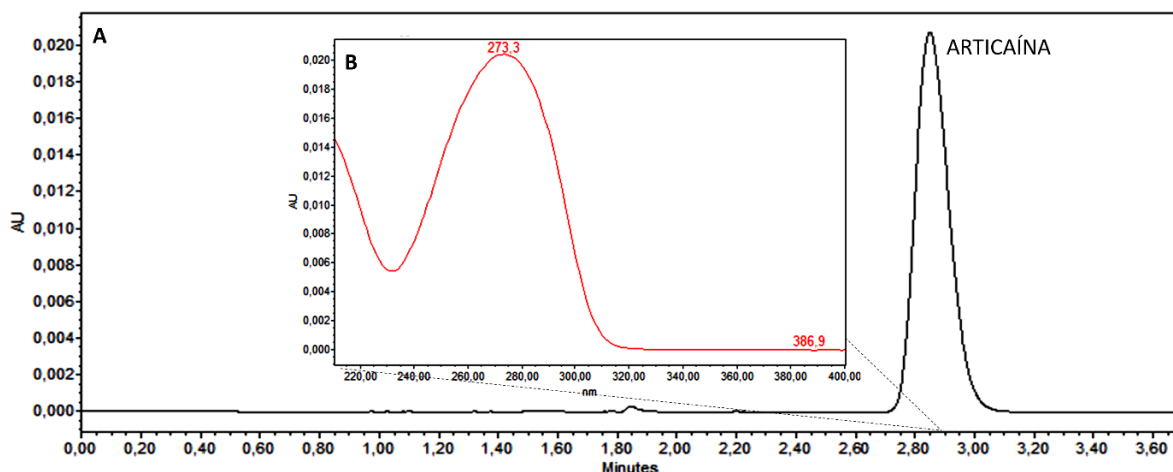


**Figura 20.** Esquema de uma sonda de microdialise utilizada no experimento. A foto da sonda foi retirada do site do fabricante (CMA Microdialysis, Kista, Suíça). Esquema adaptado de (PLOCK; KLOFT, 2005).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

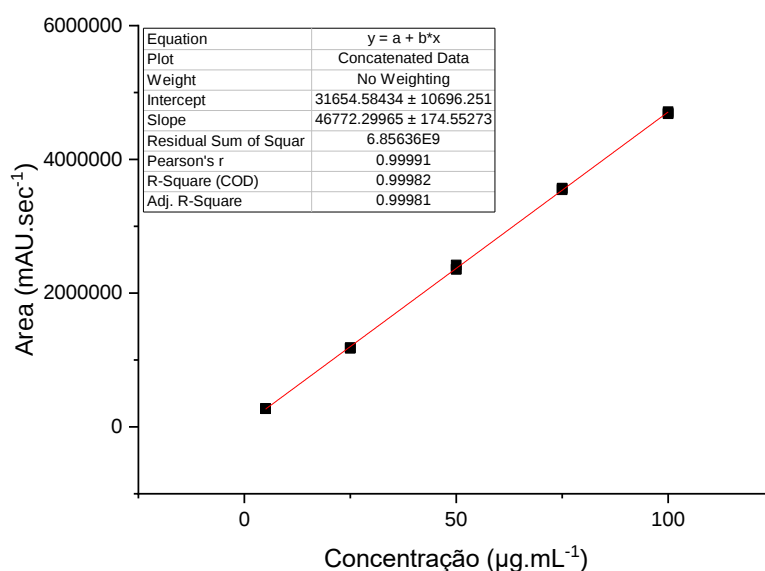
#### 3.1 Quantificação de articaína por CLAE e verificação da metodologia analítica

Utilizando as condições cromatográficas descritas, obtivemos a eluição cromatográfica da ATC no tempo de retenção de 2,85 min - conforme Figura 21A. Além disso, com o uso do detector de arranjo de fotodiodos (PDA), foi confirmado através do espectro de UV-Vis no tempo de retenção da ATC, o comprimento de onda com maior intensidade para quantificação = 273 nm, garantindo a máxima sensibilidade do método (Figura 21B). Não foram encontrados outros picos no mesmo tempo de retenção, quando injetadas amostras de NLC sem ATC. Também não foi observada qualquer impureza dos componentes, demonstrando-se, assim, a especificidade no método estabelecido.



**Figura 21.** A, Cromatograma da articaína em 273 nm e B, espectro de absorção UV-vis do articaína entre 220-400 nm no tempo de retenção de 2,85 min.

As soluções-estoque para a construção das curvas analíticas foram preparadas dissolvendo-se a ATC na fase móvel (DA SILVA et al., 2017). As concentrações usadas para a construção da curva de calibração variaram de 50 a 100,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com cinco pontos. A linearidade do método foi determinada a partir da curva analítica média, utilizando-se as curvas individuais, medidas em três dias consecutivos, como mostra a Figura 22.



**Figura 22.** Curvas analíticas para articaína na faixa de concentração de 5,0 a 100,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e análise dos parâmetros da reta média.

O coeficiente de correlação ( $r$ ) obtido foi superior a 0,990, de acordo com as recomendações da RE 166 (ANVISA, 2017), como mostra a Figura 22.

O limite de Detecção (LD) e quantificação (LQ) da ATC foram calculados de acordo

com as Equações 2 e 3 e determinados a partir do intercepto e da inclinação da curva analítica correspondente. Segundo estas análises, o LD foi  $0,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e o LQ  $1,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 3.2 Testes preliminares para escolha dos excipientes

A incorporação do fármaco pode causar alterações estruturais no interior lipídico que compõe os NLC. Por isso, no início do desenvolvimento de formulações são realizados testes preliminares, onde os componentes lipídicos selecionados são formulados com o fármaco, com a finalidade de testar a compatibilidade físico-química entre os excipientes (PUGLIA et al., 2011; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017).

Para esse projeto, foi importante encontrar misturas lipídicas que atendessem a três critérios de NLC: 1) menor tamanho de partícula, pois objetivávamos o desenvolvimento de uma formulação otimizada para uso parenteral, onde partículas com menor tamanho são preferidas (DOKTOROVÁ et al., 2016); 2) baixo índice de polidispersão (PDI) de tamanhos, na faixa de 0,1 a 0,2, indicando distribuição monodispersa de partículas (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000) e 3) formulação com consistência líquida, compatível com uso injetável, conservando-se assim, sem a presença de precipitados, ao longo do tempo. Desta forma, foram preparadas formulações teste utilizando 5 lipídios sólidos (cera de abelha sintética, miristato de miristila, palmitato de cetila, cera de abelha natural e manteiga de abacate), 3 lipídios líquidos (Dhaykol 6040, óleo de oliva e óleo de copaíba) e 3 surfactantes (Pluronic F-68, Tween 20 e Tween 80).

A escolha da quantidade dos excipientes foi baseada em experiência prévia do grupo, sendo 10% m/m de lipídios totais, 70:30% de proporção entre lipídio sólido: lipídio líquido e 5 % de surfactante. A Tabela 4 apresenta os resultados encontrados com várias formulações preparadas com lipídios sintéticos e sem o fármaco, enquanto a Tabela 5 mostra os resultados obtidos com excipientes naturais, também sem ATC.

Dentre os lipídios sintéticos, a cera de abelha sintética não apresentou formulações com as características desejadas. Como podemos ver (Tabela 4), várias formulações apresentaram precipitados, além de PDI com valor acima do desejado. Em relação as formulações com excipientes naturais, o componente cera de abelha natural também apresentou precipitados em algumas de suas formulações (Tabela 5). Assim, sem o fármaco, com exceção da cera de abelha, todos os excipientes possibilitaram a formação de nanopartículas com características desejadas. Em relação as formulações com ATC (Tabelas 6 e 7), aquelas que não atenderam aos critérios desejados foram as compostas por cera de abelha sintética. As demais formulações, preparadas

com lipídios sintéticos e naturais apresentaram as características desejadas. Notou-se também - a presença de precipitados com a cera de abelha natural, indicando possível instabilidade do sistema.

Outra informação importante, obtida nestes testes preliminares, foi o comportamento dos sistemas contendo surfactante Tween 20. Quando a formulação se apresentou estável com a utilização deste surfactante – somente as formulações com ATC: 1, 4, 7; Tabela 8 e 1, 4, 7, 10; Tabela 9) – o diâmetro médio das partículas obtidas era maior, em relação as formulações preparadas com outros surfactantes. Desta forma, o Tween 20 foi descartado, para prosseguimento do desenho experimental. Apesar do HLB do Tween 20 (~16) ser similar ao do Tween 80 (~15) (DAS; NG; TAN, 2012), não encontramos na literatura comportamento similar deste surfactante em NLC, sendo essa característica provavelmente devida a interações físico-químicas entre os excipientes utilizados nesta tese.

**Tabela 4.** Testes preliminares das formulações de NLC preparadas com lipídios sintéticos sem fármaco.

| Formulação                      |                        | 1        | 2        | 3        | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       |
|---------------------------------|------------------------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Lipídios sólidos                | C. Abelha sintética    | X        | X        | X        |         |         |         |         |         |         |
|                                 | Miristato de Miristila |          |          |          | X       | X       | X       |         |         |         |
|                                 | Palmitato de cetila    |          |          |          |         |         |         | X       | X       | X       |
| Lipídio líquido                 | Dhaykol 6040           | X        | X        | X        | X       | X       | X       | X       | X       | X       |
| Surfactantes                    | Tween 20               | X        |          |          | X       |         |         | X       |         |         |
|                                 | Tween 80               |          | X        |          |         | X       |         |         | X       |         |
|                                 | P68                    |          |          | X        |         |         | X       |         |         | X       |
| Aspecto Visual                  |                        | Líquida* | Líquida* | Líquida* | Líquida | Líquida | Líquida | Líquida | Líquida | Líquida |
| Tamanho (diâmetro médio, em nm) |                        | 323,9    | 350,8    | 271,8    | 239,7   | 225,3   | 202,0   | 281,3   | 252,8   | 220,7   |
| PDI                             |                        | 0,329    | 0,374    | 0,196    | 0,195   | 0,186   | 0,182   | 0,221   | 0,196   | 0,181   |
| Potencial Zeta (mV)             |                        | -32,5    | -31,2    | -38,8    | -39,6   | -33,0   | -24,7   | -36,3   | -30,3   | -28,4   |

\*presença de precipitado

**Tabela 5.** Testes preliminares das formulações de NLC preparadas com lipídios naturais sem fármaco.

| Formulação                      |                        | 1        | 2        | 3       | 4        | 5        | 6        | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      |
|---------------------------------|------------------------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Lipídios sólidos                | Cera de abelha natural | X        | X        | X       | X        | X        | X        |         |         |         |         |         |         |
|                                 | Manteiga de abacate    |          |          |         |          |          |          | X       | X       | X       | X       | X       | X       |
| Lipídios líquidos               | Óleo de copaíba        | X        | X        | X       |          |          |          | X       | X       | X       |         |         |         |
|                                 | Óleo de oliva          |          |          |         | X        | X        | X        |         |         |         | X       | X       | X       |
| Surfactantes                    | Tween 20               | X        |          |         | X        |          |          | X       |         |         | X       |         |         |
|                                 | Tween 80               |          | X        |         |          | X        |          |         | X       |         |         | X       |         |
|                                 | P68                    |          |          | X       |          |          | X        |         |         | X       |         |         | X       |
| Aspecto Visual                  |                        | Líquido* | Líquido* | Líquido | Líquido* | Líquido* | Líquido* | Líquido | Líquido | Líquido | Líquido | Líquido | Líquido |
| Tamanho (diâmetro médio, em nm) |                        | 284,4    | 228,7    | 251,4   | 355,0    | 292,7    | 302,9    | 239,7   | 194,7   | 207,7   | 267,1   | 235,8   | 212,4   |
| PDI                             |                        | 0,175    | 0,179    | 0,156   | 0,199    | 0,182    | 0,168    | 0,175   | 0,143   | 0,143   | 0,197   | 0,177   | 0,202   |
| Potencial Zeta (mV)             |                        | -35,8    | -32,5    | -40,4   | -36,2    | -39,5    | -45,4    | -38,7   | -30,8   | -37,5   | -36,7   | -36,1   | -40,2   |

\*presença de precipitados.

**Tabela 6.** Testes preliminares das formulações de NLC preparadas com lipídios sintéticos mais articaína.

|                                        | <b>Formulação</b>      | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> |
|----------------------------------------|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Lipídios sólidos                       | Cera Abelha sintética  | X        | X        | X        |          |          |          |          |          |          |
|                                        | Miristato de Miristila |          |          |          | X        | X        | X        |          |          |          |
|                                        | Palmitato de cetila    |          |          |          |          |          |          | X        | X        | X        |
| Lipídio líquido                        | Dhaykol 6040           | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X        |
| Surfactantes                           | Tween 20               | X        |          |          | X        |          |          | X        |          |          |
|                                        | Tween 80               |          | X        |          |          | X        |          |          | X        |          |
|                                        | P68                    |          |          | X        |          |          | X        |          |          | X        |
| Anestésico                             | Articaína 2% m/m       | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X        |
| <b>Aspecto Visual</b>                  |                        | Líquido* | Sólido   | Líquido* | Líquido* | Líquido* | Líquida  | Líquido* | Líquido  | Líquido  |
| <b>Tamanho (diâmetro médio, em nm)</b> |                        | 375,6    | -        | 276,8    | 241,4    | 234,6    | 217,8    | 265,1    | 244,9    | 242,0    |
| <b>PDI</b>                             |                        | 0,225    | -        | 0,145    | 0,169    | 0,158    | 0,153    | 0,183    | 0,163    | 0,180    |
| <b>Potencial Zeta (mV)</b>             |                        | -44,1    | -        | -50,4    | -51,3    | -48,6    | -45,8    | -50,9    | -51,3    | -49,9    |
| <b>%EE</b>                             |                        | 54,9     |          | 75,8     | 43,6     | 76,2     | 76,1     | 42,6     | 73,2     | 75,9     |

\*Presença de precipitado

**Tabela 7.** Testes preliminares das formulações de NLC preparadas com lipídios naturais mais articaína.

|                                        | <b>Formulação</b>   | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> |
|----------------------------------------|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Lipídios sólidos                       | Cera de abelha      | X        | X        | X        | X        | X        | X        |          |          |          |           |           |           |
|                                        | Manteiga de abacate |          |          |          |          |          |          | X        | X        | X        | X         | X         | X         |
| Lipídios líquidos                      | Óleo de copaíba     | X        | X        | X        |          |          |          | X        | X        | X        |           |           |           |
|                                        | Óleo de oliva       |          |          |          | X        | X        | X        |          |          |          | X         | X         | X         |
| Surfactantes                           | Tween 20            | X        |          |          | X        |          |          | X        |          |          | X         |           |           |
|                                        | Tween 80            |          | X        |          |          | X        |          |          | X        |          |           | X         |           |
|                                        | P68                 |          |          | X        |          |          | X        |          |          | X        |           |           | X         |
| Anestésico                             | Articaína 2% m/m    | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X        | X         | X         | X         |
| <b>Aspecto Visual</b>                  |                     | Líquido* | Líquido  | Líquido* | Líquido* | Líquido* | Líquido  | Líquido  | Líquido  | Líquido  | Líquido   | Líquido   | Líquido   |
| <b>Tamanho (diâmetro médio, em nm)</b> |                     | 313,1    | 253,2    | 284,4    | 322,0    | 305,0    | 382,2    | 243,4    | 216,6    | 251,3    | 268,6     | 234,4     | 232,2     |
| <b>PDI</b>                             |                     | 0,190    | 0,199    | 0,187    | 0,157    | 0,232    | 0,178    | 0,170    | 0,178    | 0,173    | 0,169     | 0,152     | 0,169     |
| <b>Potencial Zeta (mV)</b>             |                     | -52,1    | -51,4    | -48,6    | -51,3    | -51,3    | -51,6    | -45,6    | -45,0    | -50,0    | -51,4     | -53,3     | -46,9     |
| <b>%EE</b>                             |                     | 72,1     | 76,5     | 69,8     | 41,2     | 74,8     | 41,3     | 32,9     | 75,3     | 72,8     | 41,0      | 74,2      | 77,7      |

\* Presença de precipitado

Após a realização dos testes preliminares e observando os critérios desejados para uma formulação ideal, o número de formulações desejáveis ainda era grande. Escolhemos prosseguir com formulações que permitissem explorar o uso de diferentes surfactantes (Tween 80 ou Pluronic F-68) além de diferentes lipídios, naturais e sintéticos. A Tabela 8 mostra o resumo das composições lipídicas escolhidas para o prosseguimento do trabalho. Cada formulação desta tabela foi então levada ao estudo por planejamento fatorial, para encontrar a proporção adequada de cada excipiente.

**Tabela 8.** Composições escolhidas, após testes preliminares, para o prosseguimento da tese (desenvolvimento de NLC-ATC).

| Formulação | Lipídio sólido      | Lipídio líquido | Surfactante   |
|------------|---------------------|-----------------|---------------|
| NLC-CP1    | Palmitato de cetila | Dhaykol 6040    | Pluronic F-68 |
| NLC-CP2    | Palmitato de cetila | Dhaykol 6040    | Tween 80      |
| NLC-OC1    | Manteiga de abacate | Óleo de copaíba | Pluronic F-68 |
| NLC-OC2    | Manteiga de abacate | Óleo de copaíba | Tween 80      |
| NLC-OO1    | Manteiga de abacate | Óleo de oliva   | Pluronic F-68 |
| NLC-OO2    | Manteiga de abacate | Óleo de oliva   | Tween 80      |

### 3.3 Planejamento Experimental

As misturas dos lipídios escolhidos nos testes preliminares foram capazes de produzir formulações com respostas adequadas. No entanto, as quantidades ideais de cada excipiente, assim como sua influência nas propriedades de interesse, ainda não eram conhecidas. Com esta finalidade, decidiu-se realizar análise estatística baseada em planejamento experimental (DoE, *Design of Experiments*). Esta ferramenta permite, com um número reduzido de experimentos, encontrar um modelo matemático que descreva a influência dos componentes da formulação, bem como suas interações, nas propriedades de interesse. Isto permite encontrar as condições que levam à otimização efetiva do sistema (CARBONE et al., 2012). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a significância dos efeitos, suas interações e a falta de ajuste do modelo de regressão, no nível de confiança de 95%.

Para o planejamento fatorial, conforme descrito na metodologia, foi utilizado o programa *Design Expert*. Foram elaborados planejamentos experimentais 2<sup>3</sup>, com triplicata no ponto central. Sendo assim foram avaliadas três variáveis experimentais, em dois níveis (alto e baixo), com triplicata no ponto central. A Tabela 9 mostra as condições do planejamento.

Os níveis altos e baixos também foram definidos a partir de testes preliminares. A partir da escolha desses valores, foram geradas 11 combinações experimentais diferentes para cada mistura lipídica a ser formulada e, posteriormente, analisada. As formulações foram preparadas e suas propriedades foram medidas, conforme descrito em métodos. O objetivo foi encontrar formulações com menor tamanho de partícula e PDI possíveis, possibilitando administração

parenteral (DOKTOROVÁ et al., 2016). Para o PZ, era desejável ter valores maiores que 20 mV, em módulo, garantindo assim nanopartículas com maior repulsão elétrica e estabilidade de prateleira (HAN et al., 2008).

A partir das respostas obtidas foi possível gerar um modelo matemático que descrevesse a influência de cada componente na resposta desejada. O programa utilizado (*Design Expert*) revelou através da análise da variância (ANOVA) com  $p < 0,05$  os componentes significativos, isto é, aqueles que interferiam significativamente na resposta. Através da análise dos sinais dos efeitos (ou dos coeficientes do modelo) foi possível avaliar a maneira como o componente influenciava a resposta: positiva - se o componente aumentava a propriedade estudada, ou negativamente - se o componente diminuía a propriedade estudada, ou ainda se havia interação entre os componentes e como esta interação afetava a resposta. Analisamos a seguir cada formulação, separadamente. Para isso, os resultados são previamente apresentados para cada formulação (itens 3.3.1 a 3.3.6) e somente após, serão discutidos os resultados encontrados, comparando-se as formulações (item 3.3.7). Além disso, em cada formulação é apresentado um gráfico de desejabilidade, ou seja, as regiões que atendem os critérios desejados, conforme tabela 9.

**Tabela 9.** Variáveis experimentais, níveis e propriedades de interesse (respostas) para os sistemas.

| Variáveis experimentais              | Símbolos no programa       | Nível baixo | Nível alto |
|--------------------------------------|----------------------------|-------------|------------|
| Conc. Total de lipídios (TL) (% m/m) | A                          | 9           | 15         |
| Conc. Surfactante (% m/m)            | B                          | 2,5         | 5          |
| Concentração articaína (% m/m)       | C                          | 0           | 4          |
| Propriedades de interesse            | Critérios (Desejabilidade) |             |            |
| Tamanho da partícula (nm)            | Mínimo                     |             |            |
| Índice de polidispersão (PDI)        | Mínimo                     |             |            |
| Potencial Zeta (mV)                  | $>  20 $                   |             |            |

### 3.3.1 Formulação NLC-CP1: CP+DK+P68

Para esta composição de excipientes, foram encontradas as respostas da Tabela 10. Para todas as respostas estudadas, o modelo gerado foi significativo, com exceção do termo da curvatura para a resposta PDI. O efeito dos excipientes nas respostas de interesse é mostrado na Tabela 11. Cabe ressaltar que em todas as formulações o potencial zeta das nanopartículas foram sempre negativos, porém expressos em todas as tabelas em módulo.

**Tabela 10.** Composição das formulações e respostas obtidas no planejamento experimental 2<sup>3</sup> para encapsulação do anestésico articaína utilizando como excipientes palmitato de cetila, Dhaykol 6040 e Pluronic F-68.

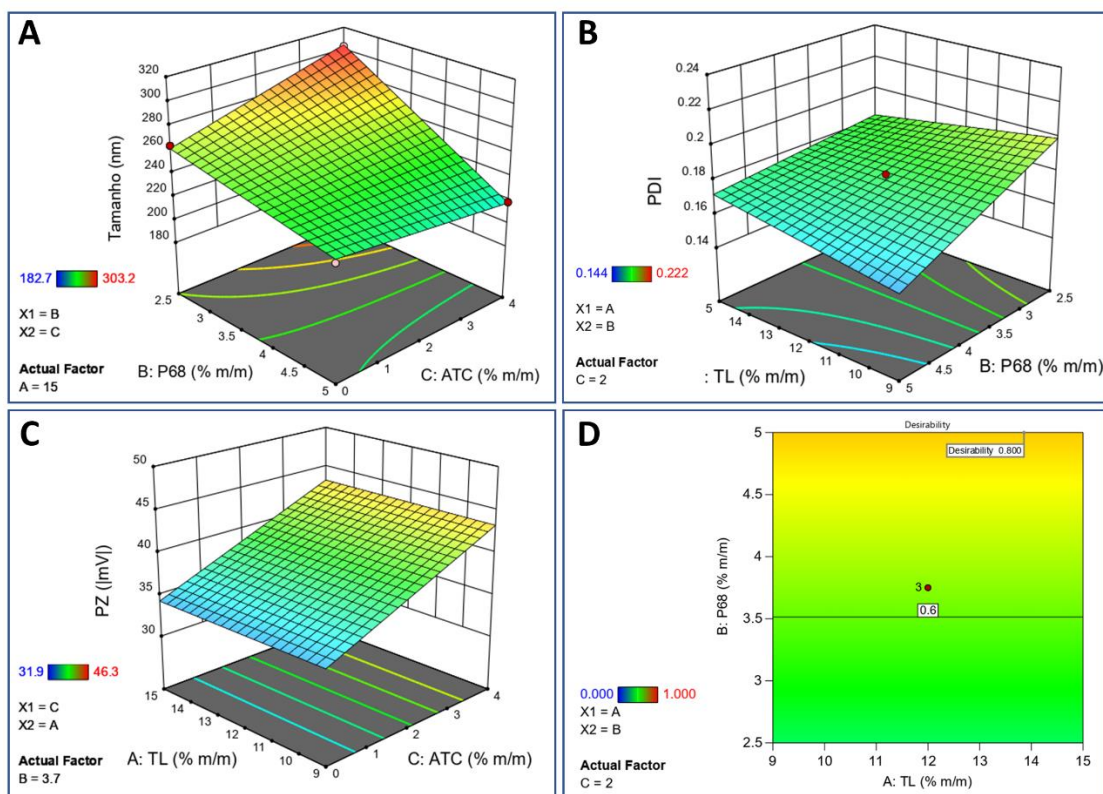
| Amostra | A                            | B                           | C                 | Respostas                  |       |                    |
|---------|------------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------|-------|--------------------|
|         | Conc. Total lipídios (% m/m) | Conc. Pluronic F-68 (% m/m) | Conc. ATC (% m/m) | Tamanho de partículas (nm) | PDI   | Potencial Zeta  mV |
| 6       | 9                            | 2,5                         | 0                 | 293,2                      | 0,222 | 33,3               |
| 3       | 15                           | 2,5                         | 0                 | 263,6                      | 0,195 | 35,1               |
| 1       | 9                            | 5                           | 0                 | 271,7                      | 0,174 | 31,9               |
| 7       | 15                           | 5                           | 0                 | 231,3                      | 0,188 | 36,8               |
| 11      | 9                            | 2,5                         | 4                 | 271,5                      | 0,184 | 44,1               |
| 2       | 15                           | 2,5                         | 4                 | 303,2                      | 0,176 | 46,3               |
| 9       | 9                            | 5                           | 4                 | 182,7                      | 0,144 | 40,9               |
| 4       | 15                           | 5                           | 4                 | 218,4                      | 0,160 | 41,8               |
| 10      | 12                           | 3,75                        | 2                 | 226,0                      | 0,181 | 45,3               |
| 5       | 12                           | 3,75                        | 2                 | 225,0                      | 0,160 | 40,9               |
| 8       | 12                           | 3,75                        | 2                 | 230,0                      | 0,169 | 45,8               |

**Tabela 11.** Componentes com efeitos significativos e suas interações em cada resposta analisada para a formulação contendo palmitato de cetila, Dhaykol 6040 e Pluronic F-68 e articaína.

| Resposta              | Efeito positivo | Efeito negativo |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Tamanho de partículas | -               | P68, AC, BC     |
| PDI                   | -               | P68, ATC, AB    |
| Potencial Zeta        | ATC             | -               |

A= Concentração total de lipídios (TL), B= Concentração surfactante e C= Concentração de articaína.

Para a resposta tamanho de partículas, o surfactante P68 exerceu efeito negativo. Este efeito do surfactante na formulação final era esperado, já que o tensoativo diminui a tensão superficial entre as fases lipídica e aquosa, levando assim à formação de nanopartículas de tamanhos menores e impedindo a coalescência de gotículas maiores. Confirmando este achado, outros pesquisadores também relataram a redução do tamanho de partículas quando em maiores concentrações de surfactante (DAS NEVES; SARMENTO, 2015; DAS; NG; TAN, 2012; PRADHAN et al., 2015; RAHMAN; ZIDAN; KHAN, 2010). É interessante notar também a interação entre surfactante com ATC, que também promoveu menor tamanho de partículas (Figura 23A). No mesmo sentido, quando analisamos a resposta PDI, estes dois componentes diminuíram a polidispersão de tamanhos. Neste caso, a ATC por sua hidrofiliabilidade pode ter uma localização preferencial na superfície das nanopartículas (NAHAK et al., 2015), interagindo diretamente com o P68, o que pode também justificar o efeito da ATC no PZ, aumentando-o (Figura 23C). Ou seja, provavelmente a ATC, ou uma fração dela, localiza-se na interface das nanopartículas lipídicas com a fase aquosa.



**Figura 23.** NLC-CP1: gráficos de superfície para as respostas: **A**, tamanho de partículas; **B**, PDI e **C**, potencial Zeta (PZ). **D**, gráfico de Desejabilidade.

### 3.3.2 Formulação NLC-CP2: CP+DK+T80

Para esta composição de excipientes, que difere da formulação anterior pela troca do surfactante (de P68 para Tween 80), foram encontradas as respostas da Tabela 12. Para todas as respostas estudadas, o modelo gerado foi significativo, com exceção da adição do termo de curvatura para a resposta PZ. O efeito dos excipientes nas respostas de interesse está apresentado na Tabela 13.

**Tabela 12.** Composição das formulações e respostas obtidas no planejamento experimental 2<sup>3</sup> para encapsulação do anestésico articaína utilizando como excipientes palmitato de cetila, Dhaykol 6040 e Tween 80.

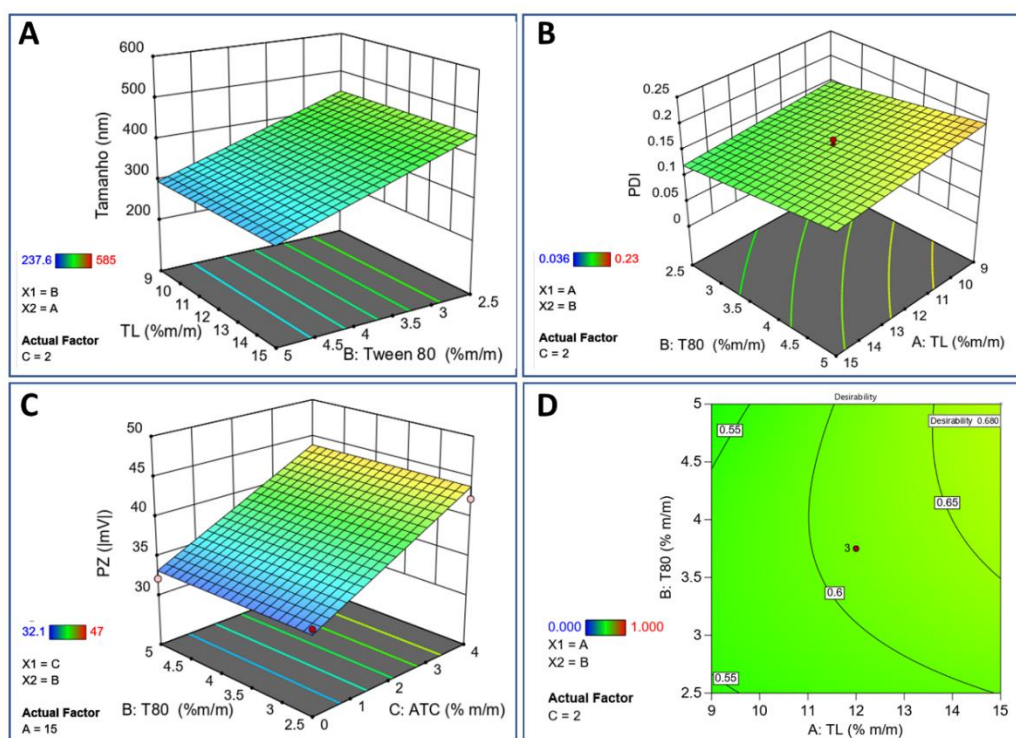
| Amostra | A                            | B                      | C                 | Respostas                  |       |                      |
|---------|------------------------------|------------------------|-------------------|----------------------------|-------|----------------------|
|         | Conc. Total lipídios (% m/m) | Conc. Tween 80 (% m/m) | Conc. ATC (% m/m) | Tamanho de partículas (nm) | PDI   | Potencial Zeta   -mV |
| 8       | 9                            | 2,5                    | 0                 | 405,7                      | 0,205 | 33,4                 |
| 3       | 15                           | 2,5                    | 0                 | 585,0                      | 0,036 | 33,8                 |
| 9       | 9                            | 5                      | 0                 | 309,4                      | 0,230 | 33,3                 |
| 11      | 15                           | 5                      | 0                 | 281,2                      | 0,176 | 32,1                 |
| 7       | 9                            | 2,5                    | 4                 | 326,9                      | 0,095 | 43,7                 |
| 5       | 15                           | 2,5                    | 4                 | 480,2                      | 0,208 | 42,3                 |
| 2       | 9                            | 5                      | 4                 | 293,3                      | 0,163 | 47,0                 |
| 4       | 15                           | 5                      | 4                 | 297,2                      | 0,138 | 42,4                 |
| 1       | 12                           | 3,75                   | 2                 | 296,0                      | 0,157 | 43,8                 |
| 10      | 12                           | 3,75                   | 2                 | 282,6                      | 0,157 | 44,4                 |
| 6       | 12                           | 3,75                   | 2                 | 237,6                      | 0,169 | 42,1                 |

**Tabela 13.** Componentes com efeitos significativos e suas interações em cada resposta analisada para a formulação contendo palmitato de cetila, Dhaykol 6040, Tween80 e articaína.

| Resposta              | Efeito positivo | Efeito negativo  |
|-----------------------|-----------------|------------------|
| Tamanho de partículas | -               | T80              |
| PDI                   | T80, AC         | TL, ATC, BC, ABC |
| Potencial Zeta        | ATC             | -                |

A= Concentração total de lípidios (TL), B= Concentração surfactante e C= Concentração de articaína.

Também nesse caso, para a resposta tamanho de partículas somente o surfactante T80 apresentou um efeito negativo, ou seja, quanto maior sua quantidade, menor o tamanho dos NLC (Figura 24A). Em relação ao PDI, obtivemos respostas diferentes do esperado, pois o surfactante T80 sozinho apresentou um efeito positivo, porém quando interagindo com os outros fatores da formulação, seu efeito foi o de diminuir a polidispersão de tamanhos (Figura 24B). Nesta formulação a ATC exerceu um efeito negativo no PDI, mas positivo no PZ (Figura 24C), reforçando a hipótese de uma inserção superficial da ATC nas nanopartículas lipídicas.



**Figura 24.** NLC-CP2: gráficos de superfície para as respostas: **A**, tamanho de partículas; **B**, PDI e **C**, potencial Zeta (PZ). **D**, gráfico de desejabilidade.

### 3.3.3 Formulação NLC-OC1: MA + OC + P68

A partir desta formulação, utilizamos excipientes naturais. Desta forma, o planejamento experimental tornou-se ainda mais importante por tratar-se de excipientes de composição complexa e poucos estudados (RIBEIRO et al., 2017). Neste planejamento, para todas as respostas estudadas, obtivemos um modelo matemático linear significativo, sem falta de ajuste. As respostas

obtidas para cada formulação encontram-se na Tabela 14, enquanto os excipientes que alteraram de forma significativa as respostas, estão na Tabela 15.

**Tabela 14.** Composição das formulações e respostas obtidas no planejamento experimental 2<sup>3</sup> para encapsulação do anestésico articaína utilizando como excipientes manteiga de abacate, óleo de copaíba e Pluronic F-68.

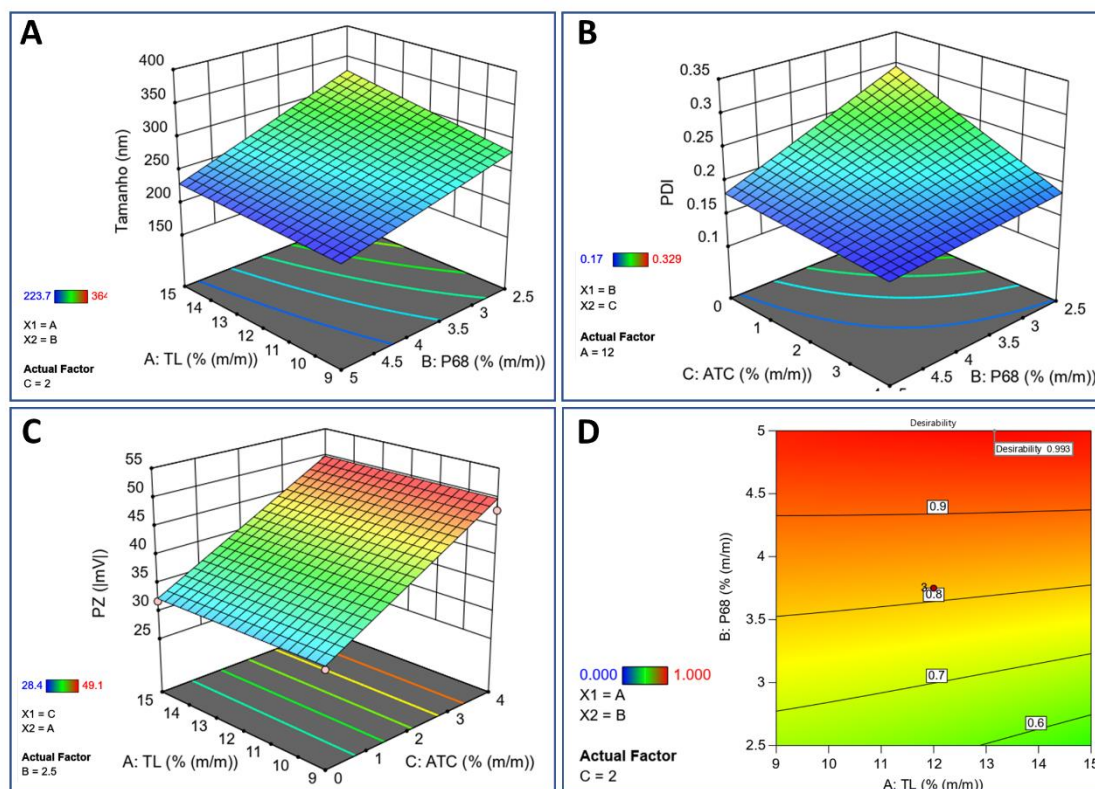
| Amostra | A                            | B                           | C                 | Respostas                  |       |                      |
|---------|------------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------|-------|----------------------|
|         | Conc. Total lipídios (% m/m) | Conc. Pluronic F-68 (% m/m) | Conc. ATC (% m/m) | Tamanho de partículas (nm) | PDI   | Potencial Zeta [-mV] |
| 8       | 9                            | 2,5                         | 0                 | 308,1                      | 0,329 | 31,7                 |
| 3       | 15                           | 2,5                         | 0                 | 364,8                      | 0,281 | 31,8                 |
| 9       | 9                            | 5                           | 0                 | 223,7                      | 0,204 | 28,4                 |
| 11      | 15                           | 5                           | 0                 | 237,1                      | 0,179 | 29,7                 |
| 7       | 9                            | 2,5                         | 4                 | 271,1                      | 0,194 | 47,8                 |
| 5       | 15                           | 2,5                         | 4                 | 307,5                      | 0,198 | 49,1                 |
| 2       | 9                            | 5                           | 4                 | 231,2                      | 0,181 | 48,0                 |
| 4       | 15                           | 5                           | 4                 | 238,8                      | 0,170 | 46,8                 |
| 1       | 12                           | 3,75                        | 2                 | 238,2                      | 0,170 | 46,8                 |
| 10      | 12                           | 3,75                        | 2                 | 250,6                      | 0,197 | 46,6                 |
| 6       | 12                           | 3,75                        | 2                 | 240,8                      | 0,178 | 45,0                 |

**Tabela 15.** Componentes com efeito significativo e suas interações, em cada resposta analisada para as formulações contendo manteiga de abacate, óleo de copaíba, Pluronic F-68 e articaína.

| Resposta              | Efeito positivo | Efeito negativo |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Tamanho de partículas | A               | P68             |
| PDI                   | -               | P68, ATC        |
| Potencial Zeta        | ATC             | -               |

A= Concentração total de lipídios (TL)

Em relação ao tamanho de partículas, conforme esperado, o aumento na concentração de lipídios promoveu aumento no tamanho das partículas, enquanto o surfactante P68 teve efeito negativo no tamanho (Figura 25A). O surfactante exerceu efeito negativo também na resposta PDI, como esperado (Figura 25B). A ATC, também nesse sistema influenciou a resposta PDI, (negativamente) e o PZ (positivamente) (Figura 25C).



**Figura 25.** NLC-CO1: Gráficos de superfície para as respostas: **A**, tamanho de partículas; **B**, PDI e **C**, potencial Zeta (PZ). **D**, gráfico de desejabilidade.

### 3.3.4 Formulação NLC-CO2: MA + OC + T80

Neste grupo de formulações foi alterado somente o tipo de surfactante em relação a composição das formulações anteriores. Também para este planejamento, os modelos gerados para cada resposta foram significativos e sem falta de ajuste. Os resultados encontrados estão na Tabela 16, e a influência de cada fator nas respostas estudadas é mostrada na Tabela 17.

**Tabela 16.** Composição das formulações e respostas obtidas no planejamento experimental 2<sup>3</sup> para encapsulação do anestésico articaína utilizando como excipientes manteiga de abacate, óleo de copaíba e Tween 80.

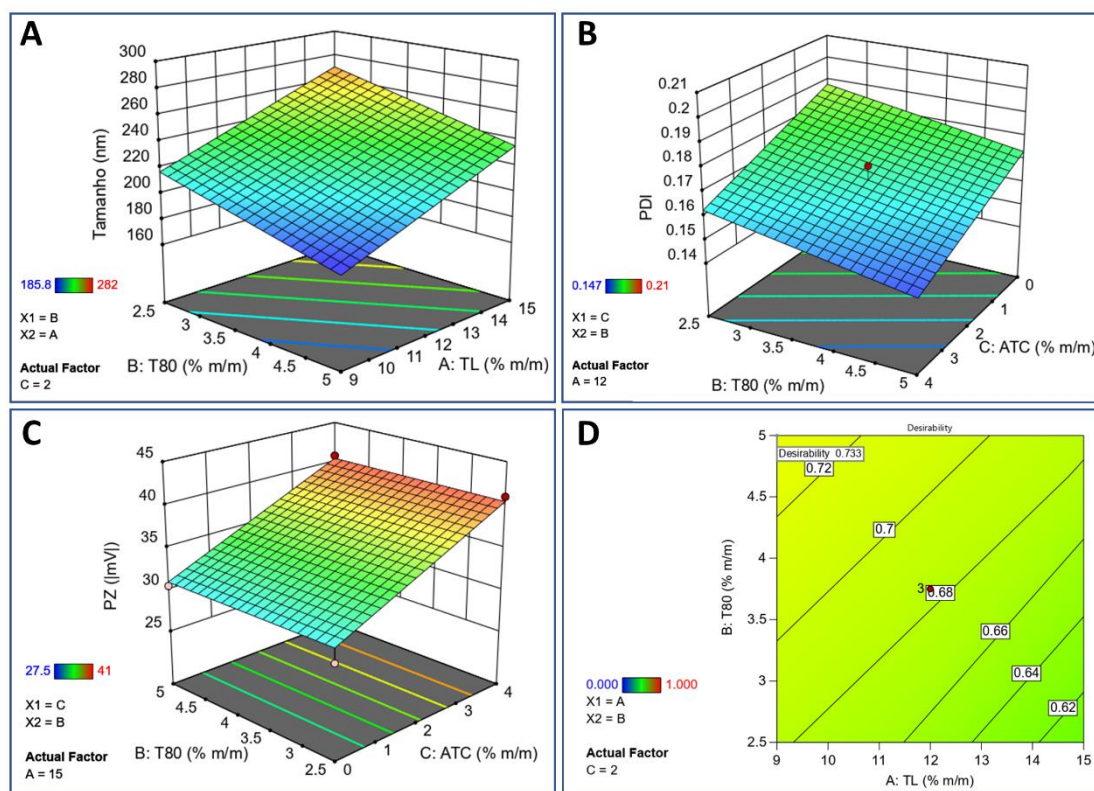
| Amostra | A                            | B                      | C                 | Respostas                  |       |                    |
|---------|------------------------------|------------------------|-------------------|----------------------------|-------|--------------------|
|         | Conc. Total lipídios (% m/m) | Conc. Tween 80 (% m/m) | Conc. ATC (% m/m) | Tamanho de partículas (nm) | PDI   | Potencial Zeta  mV |
| 8       | 9                            | 2,5                    | 0                 | 236,4                      | 0,181 | 31,3               |
| 3       | 15                           | 2,5                    | 0                 | 282,0                      | 0,210 | 29,3               |
| 9       | 9                            | 5                      | 0                 | 185,8                      | 0,164 | 27,5               |
| 11      | 15                           | 5                      | 0                 | 266,3                      | 0,181 | 30,5               |
| 7       | 9                            | 2,5                    | 4                 | 203,9                      | 0,165 | 38,3               |
| 5       | 15                           | 2,5                    | 4                 | 268,1                      | 0,158 | 41,0               |
| 2       | 9                            | 5                      | 4                 | 187,6                      | 0,147 | 36,4               |
| 4       | 15                           | 5                      | 4                 | 211,6                      | 0,164 | 40,8               |
| 1       | 12                           | 3,75                   | 2                 | 219,3                      | 0,151 | 40,2               |
| 10      | 12                           | 3,75                   | 2                 | 207,7                      | 0,153 | 38,5               |
| 6       | 12                           | 3,75                   | 2                 | 217,7                      | 0,174 | 39,0               |

**Tabela 17.** Componentes com efeitos significativos e suas interações em cada resposta analisada para a formulação contendo manteiga de abacate, óleo de copaíba, Tween 80 e ATC.

| Resposta              | Efeito positivo | Efeito negativo |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Tamanho de partículas | TL              | T80, ATC, ABC   |
| PDI                   | -               | ATC             |
| Potencial Zeta        | ATC             | -               |

A= Concentração total de lípidios (TL), B= Concentração surfactante e C= Concentração de articaína.

Para a resposta tamanho de partículas, a concentração de lipídios teve efeito positivo, enquanto o T80, efeito negativo (Figura 26A). Diferente do grupo das formulações com óleo de copaíba e P68, nestas formulações com T80 a ATC parece exercer uma propriedade surfactante influenciando, de forma negativa, as respostas tamanho e PDI (Tabela 17). Como nas formulações anteriores, a ATC aumentou, em módulo, os valores de PZ (Figura 26C).



**Figura 26.** NLC-CO2: gráficos de superfície para as respostas: **A**, tamanho de partículas; **B**, PDI e **C**, potencial Zeta (PZ). **D**, gráfico de desejabilidade.

### 3.3.5 Formulação NLC-OO1: MA + OO + P68

Neste grupo de formulações foi utilizado o óleo de oliva como lipídio líquido. As respostas obtidas para cada formulação estão na Tabela 18. Para todas as respostas os modelos matemáticos gerados foram significativos e sem falta de ajuste. Os componentes que interferiram significativamente nas respostas estudadas são apresentados na Tabela 19.

**Tabela 18.** Composição das formulações e respostas obtidas no planejamento experimental 2<sup>3</sup> para encapsulação do anestésico articaína utilizando como excipientes manteiga de abacate, óleo de oliva e Pluronic F-68.

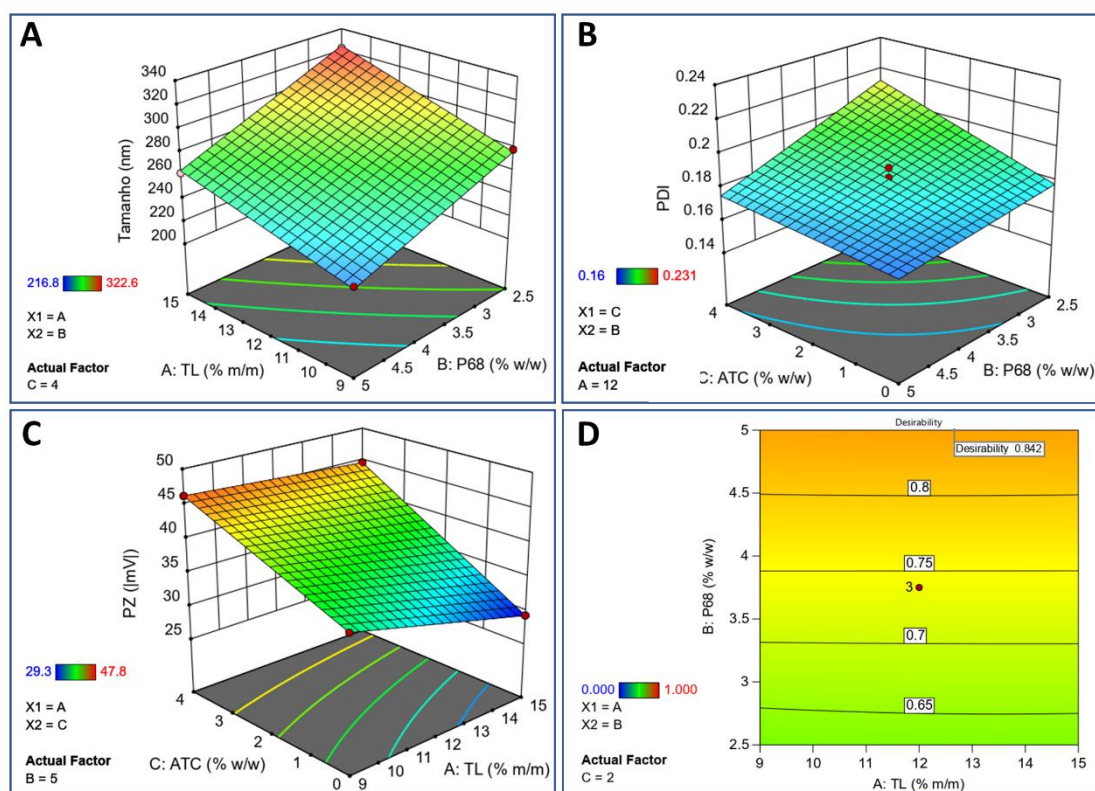
| Amostra | A                            | B                           | C                 | Respostas                  |       |                      |
|---------|------------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------|-------|----------------------|
|         | Conc. Total lipídios (% m/m) | Conc. Pluronic F-68 (% m/m) | Conc. ATC (% m/m) | Tamanho de partículas (nm) | PDI   | Potencial Zeta [-mV] |
| 8       | 9                            | 2,5                         | 0                 | 254,3                      | 0,169 | 32,1                 |
| 3       | 15                           | 2,5                         | 0                 | 227,8                      | 0,187 | 33,8                 |
| 9       | 9                            | 5                           | 0                 | 283,4                      | 0,160 | 36,4                 |
| 11      | 15                           | 5                           | 0                 | 216,8                      | 0,173 | 29,3                 |
| 7       | 9                            | 2,5                         | 4                 | 278,8                      | 0,231 | 46,5                 |
| 5       | 15                           | 2,5                         | 4                 | 322,6                      | 0,194 | 47,8                 |
| 2       | 9                            | 5                           | 4                 | 229,8                      | 0,171 | 46,2                 |
| 4       | 15                           | 5                           | 4                 | 262,5                      | 0,179 | 44,6                 |
| 1       | 12                           | 3,75                        | 2                 | 254,1                      | 0,190 | 42,2                 |
| 10      | 12                           | 3,75                        | 2                 | 250,3                      | 0,184 | 45,5                 |
| 6       | 12                           | 3,75                        | 2                 | 254,4                      | 0,179 | 45,3                 |

**Tabela 19.** Componentes com efeitos significativos e suas interações em cada resposta analisada para a formulação contendo manteiga de abacate, óleo de oliva, Pluronic F-68 e articaína.

| Resposta             | Efeito positivo | Efeito negativo |
|----------------------|-----------------|-----------------|
| Tamanho de partícula | AC, ATC         | P68, AB, BC     |
| PDI                  | ATC, ABC, AB    | P68, AC, BC     |
| Potencial Zeta       | ATC             | -               |

A= Concentração total de lipídios (TL), B= Concentração surfactante e C= Concentração de articaína.

Para a resposta tamanho de partículas, o P68 e suas interações com outras variáveis tiveram efeito negativo no tamanho dos NLC (Figura 27A). Já a ATC, diferentemente das outras formulações estudadas, exerceu uma influência positiva, tanto no tamanho, quanto no PDI e PZ (Figuras 27B e C).



**Figura 27.** NLC-OO1: gráficos de superfície para as respostas: **A**, tamanho de partículas; **B**, PDI e **C**, potencial Zeta (PZ). **D**, gráfico de desejabilidade.

### 3.3.6 Formulação NLC-OO2: MA + OO + T80

Nestas formulações, em relação ao grupo anterior, apenas o surfactante foi trocado (de P68 para T80). Os resultados encontrados estão na Tabela 20, e os fatores significantes nas respostas estão na Tabela 21. Para todas as respostas os modelos matemáticos gerados foram significativos e sem falta de ajuste.

**Tabela 20.** Composição das formulações e respostas obtidas no planejamento experimental 2<sup>3</sup> para encapsulação do anestésico ATC utilizando como excipientes manteiga de abacate, óleo de oliva e Tween 80.

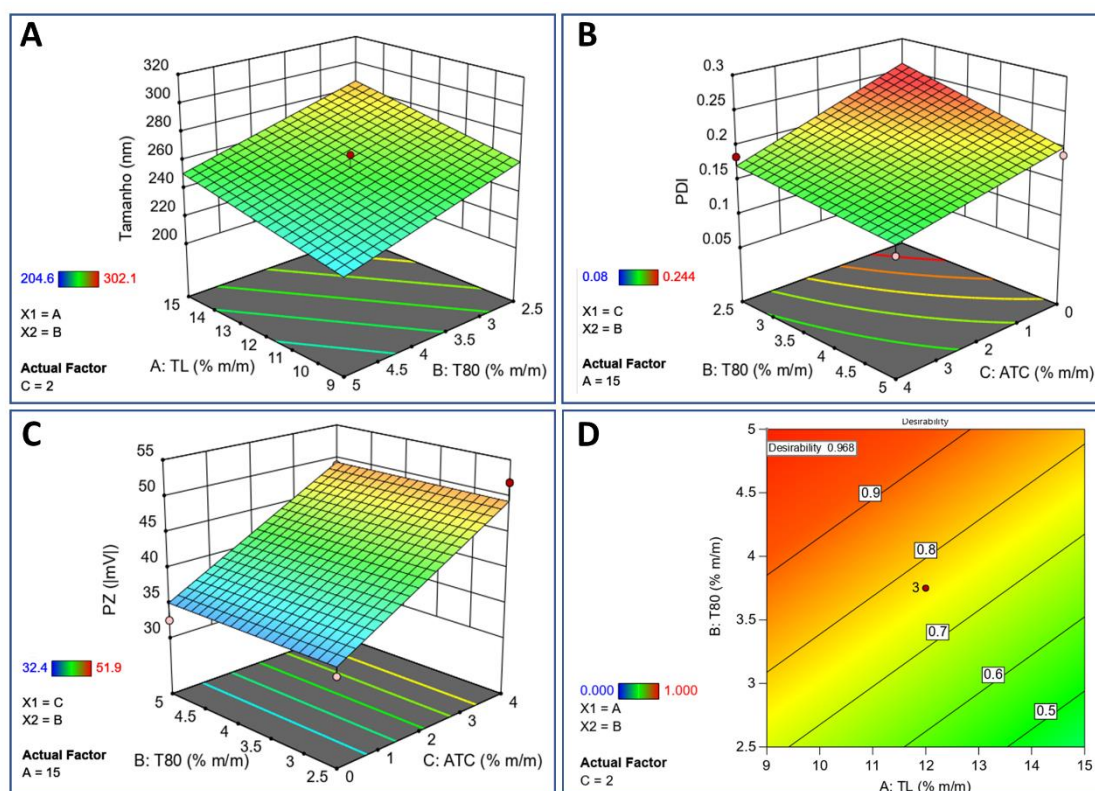
| Amostra | A                            | B                      | C                 | Respostas                  |       |                    |
|---------|------------------------------|------------------------|-------------------|----------------------------|-------|--------------------|
|         | Conc. Total lipídios (% m/m) | Conc. Tween 80 (% m/m) | Conc. ATC (% m/m) | Tamanho de partículas (nm) | PDI   | Potencial Zeta  mV |
| 8       | 9                            | 2,5                    | 0                 | 252,2                      | 0,196 | 33,2               |
| 3       | 15                           | 2,5                    | 0                 | 302,1                      | 0,244 | 33,8               |
| 9       | 9                            | 5                      | 0                 | 204,6                      | 0,201 | 32,4               |
| 11      | 15                           | 5                      | 0                 | 250,7                      | 0,189 | 32,5               |
| 7       | 9                            | 2,5                    | 4                 | 264,5                      | 0,148 | 41,4               |
| 5       | 15                           | 2,5                    | 4                 | 282,6                      | 0,184 | 51,9               |
| 2       | 9                            | 5                      | 4                 | 260,9                      | 0,080 | 46,8               |
| 4       | 15                           | 5                      | 4                 | 243,9                      | 0,133 | 48,9               |
| 1       | 12                           | 3,75                   | 2                 | 250,4                      | 0,234 | 46,1               |
| 10      | 12                           | 3,75                   | 2                 | 243,3                      | 0,176 | 49,7               |
| 6       | 12                           | 3,75                   | 2                 | 265,6                      | 0,191 | 47,3               |

**Tabela 21.** Componentes com efeitos significativos e suas interações em cada resposta analisada para a formulação contendo manteiga de abacate, óleo de oliva, Tween 80 e articaína.

| Resposta              | Efeito positivo | Efeito negativo |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Tamanho de partículas | TL              | T80             |
| PDI                   | -               | ATC             |
| Potencial Zeta        | ATC             | -               |

Concentração total de lípidios (TL)

O tamanho de partículas foi positivamente modulado pela concentração de lípidios e negativamente pelo surfactante (Figura 28A). O PDI foi negativamente alterado pela ATC (Figura 28B) que teve efeito positivo no PZ (Figura 28C).



**Figura 28.** NLC-OO2: gráficos de superfície para as respostas: **A**, tamanho de partículas; **B**, PDI e **C**, potencial Zeta (PZ). **D**, Gráficos de desejabilidade.

### 3.3.7 Comparação entre as formulações

A Tabela 22 apresenta a compilação dos resultados encontrados nos 6 planejamentos experimentais realizados, permitindo comparar as diferenças nos sistemas quanto as misturas lipídicas (sintética e naturais), os diferentes surfactantes e a influência da ATC nas nanopartículas produzidas. A variação dos fatores foi sempre a mesma (Tabela 9), ou seja, sempre foi usada a mesma concentração dos diferentes excipientes empregados.

**Tabela 22.** Compilação dos dados dos seis planejamentos experimentais realizados no trabalho para encapsulação do anestésico articaína.

| Formulação | Varição do Tamanho (nm) | Excipiente significativo no tamanho Pos. / Neg. |          | Varição do PDI | Excipiente significativo no PDI Pos. / Neg. |          | Varição do Potencial Zeta [mV] | Excipiente significativo No P. Zeta Pos. / Neg. |   |
|------------|-------------------------|-------------------------------------------------|----------|----------------|---------------------------------------------|----------|--------------------------------|-------------------------------------------------|---|
| NLC-CP1    | 182,7 – 303,2           | -                                               | P68      | 0,160 – 0,188  | -                                           | P68, ATC | 31,9 – 46,3                    | ATC                                             | - |
| NLC-CP2    | 237,6 – 585,0           | -                                               | T80      | 0,095 – 0,230  | T80                                         | TL, ATC  | 32,1 – 47,0                    | ATC                                             | - |
| NLC-OC1    | 223,7 – 364,8           | TL                                              | P68      | 0,170 – 0,329  | -                                           | P68, ATC | 31,7 – 49,1                    | ATC                                             | - |
| NLC-OC2    | 187,6 – 282,0           | TL                                              | T80, ATC | 0,147 – 0,210  | -                                           | ATC      | 27,5 – 41,0                    | ATC                                             | - |
| NLC-OO1    | 216,8 – 322,0           | ATC                                             | P68      | 0,160 – 0,231  | ATC                                         | P68      | 29,3 – 47,8                    | ATC                                             | - |
| NLC-OO2    | 204,6 – 302,1           | TL                                              | T80      | 0,080 – 0,244  | -                                           | ATC      | 32,5 – 51,9                    | ATC                                             | - |

CP – Palmitato de Cetila; DK – Dhaykol 6040; MA – Manteiga de abacate; OC – Óleo de copaíba; OO – Óleo de oliva; P68 – Pluronic F-68; T80 – Tween 80; TL- Total de lipídios; ATC – Articaína.

Em relação ao tamanho de partículas, as NLC contendo ATC sofreram, principalmente, a influência dos surfactantes, seguida daquela da concentração lipídica. Esse era um resultado esperado, considerando-se resultados anteriores do grupo (RIBEIRO et al., 2017; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017). Porém, vimos que os surfactantes P68 e T80 influenciaram os sistemas compostos por lipídios sintéticos e naturais de maneira diferente: enquanto nas formulações com lipídios sintéticos o P-68 foi quem mais alterou o tamanho das nanopartículas (reduzindo o tamanho), naquelas preparadas com lipídios naturais, foi o T80 quem produziu formulações com nanopartículas menores.

Não há, na literatura, indicações de qual seria o melhor surfactante para uma dada composição de NLC. Bhupinder & Amj, compararam NLC preparadas com estes dois surfactantes (P68 e T80) e encontraram menores partículas com uso de P68 (BHUPINDER; AMJ, 2016), enquanto outros autores reportaram que o T80 produziu partículas com menores diâmetros (FANG et al., 2008; YERUERL et al., 2001). Neste caso, o valor do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) e a concentração de surfactantes podem ser indicativos para a escolha do melhor surfactante (BABAZADEH; GHANBARZADEH; HAMISHEHKAR, 2017). Provavelmente as formulações com lipídios sintéticos como o palmitato de cetila - com alta hidrofobicidade e alto peso molecular, que aumentam a viscosidade do sistema - requerem um surfactante com maior HLB. Por isso, P68 mostra-se melhor nesses sistemas. Outro fator descrito na literatura é o aumento da viscosidade causado pelo T80; este aumento na viscosidade na fase aquosa do sistema, dificultaria a homogeneização durante o processo de formação das partículas, levando a um aumento de tamanho (GONZALEZ-MIRA et al., 2010). Estas duas vertentes são plausíveis para explicar as diferenças encontradas nos sistemas com diferentes surfactantes, porém a literatura sobre o aspecto molecular, ou que descrevam o arranjo molecular dos componentes das nanopartículas lipídicas ainda é escassa para a compreensão de tais resultados.

Quando analisamos o PDI, um interessante fator significativo para todas as formulações, foi a ATC. Ela está presente como fator significativo nesse parâmetro em praticamente todos os

sistemas utilizados. Na maioria dos casos ela ajudou, diminuindo a polidispersão de tamanhos. Somente na formulação NLC-OO1 (MA+OO+P68), a ATC desencadeou um aumento na polidispersão. Esse resultado é compatível com a literatura, quando se utiliza P68 como surfactante (DA SILVA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2016, 2017). Entretanto, quando T80 foi usado, o efeito da ATC parece prevalecer (contribuindo negativamente), tal que o surfactante T80 não aparece como fator significativo no PDI destes sistemas (o que era esperado, já que T80 teve até um efeito positivo na formulação NLC-CP2). A partir desses resultados, começamos a especular sobre a possível localização da ATC, ou fração dela, na superfície das nanopartículas, interagindo diretamente com o surfactante T80. Nesta linha de raciocínio, em membranas modelo, a ATC neutra se insere na cabeça próximo a sua cabeça polar (PRATES et al., 2020). Desta forma, a inserção preferencial na superfície externa das nanopartículas, ao invés de no interior lipídico, parece ser a mais provável.

Para a resposta PZ, vemos que o fator que mais afetou esse parâmetro de forma positiva, em todas as formulações, foi a ATC. Sendo o PZ indicativo do valor da carga superficial das nanopartículas e está sendo afetado diretamente pela presença de ATC nos sistemas, o resultado encontrado indica a presença desta na superfície das nanopartículas. Resultados semelhantes foram observados na encapsulação de outros AL do tipo amino-amida em NLC (NAHAK et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017). Como a medida do PZ é influenciada pela quantidade de íons em solução, outra possibilidade para explicar este efeito seria que, a fração não encapsulada de ATC possa estar contribuindo para o aumento, em módulo, do PZ.

### *3.3.8 Escolha das melhores formulações de NLC com articaína*

Como dito anteriormente, na escolha de uma formulação ideal, aquelas com menor tamanho e PDI e maior PZ (ou  $>|-20|$ ) foram preferidas. Em todos os tipos de formulações testadas com ATC, encontramos algumas (gráficos de desejabilidade) que atendiam estes critérios com maiores desejabilidades. Porém, optou-se por não escolher uma quantidade diferente de cada excipiente, para cada mistura testada. Assim, para ter um critério de comparação nos testes posteriores do projeto, escolhemos formulações com a mesma quantidade de excipientes. Desta forma, as formulações escolhidas foram sempre as do ponto central de cada planejamento experimental, tal que todas elas atendiam aos critérios desejados para formulações ideais e possuíam as mesmas concentrações lipídicas (12,5% m/m), de surfactante (3,75% m/m) e de ATC (2% m/m). Assim, nos testes subsequentes pudemos avaliar a influência do tipo de lipídio e de surfactante usado, pois todas as formulações contêm a mesma quantidade de excipientes. Em relação à ATC, ela comercialmente na concentração de 4%. As formulações 1 e 4 - com ATC 4%,

apresentaram instabilidade, com precipitação do fármaco depois de 3 meses de preparo. Por isso, e para manter o critério de utilizar sempre a mesma quantidade de ativo em todas as formulações, escolheu-se trabalhar na concentração de 2% ATC.

### 3.4 Caracterização físico-química das amostras escolhidas

Seis formulações de NLC selecionadas, compostas por 12,5 % m/m de lipídios (70:30 % lipídio sólido: lipídio líquido e 3,75% de surfactante). Foram preparadas formulações com e sem ATC (2%) e os resultados da sua caracterização físico-química (diâmetro médio, PDI, PZ e n° de partículas/mL) são apresentados na Tabela 23. Além disso o pH das formulações com ATC variaram de 7,5 a 8,0. As formulações sem ATC permitiram verificar se o fármaco provocava mudanças no sistema, alterando suas propriedades e estabilidade.

**Tabela 23.** Caracterização das formulações otimizadas e seus respectivos controles sem articaína em relação ao diâmetro médio (tamanho), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ), concentração de nanopartículas (número de partículas.mL<sup>-1</sup>), eficiência de encapsulação (%EE) e capacidade de carregamento, em porcentagem (%DL).

| Formulação | Tamanho (nm) | PDI           | PZ (mV)     | N° de partículas [x10 <sup>13</sup> .mL <sup>-1</sup> ] | %EE        | %DL       |
|------------|--------------|---------------|-------------|---------------------------------------------------------|------------|-----------|
| NLC-CP1-A  | 237,0 ± 0,4  | 0,167 ± 0,001 | -38,3 ± 0,5 | 4,68 ± 0,27                                             | 73,3 ± 0,2 | 8,2 ± 0,1 |
| NLC-CP1    | 230,6 ± 2,5  | 0,099 ± 0,013 | -31,1 ± 0,7 | 6,96 ± 0,14                                             | -          | -         |
| NLC-CP2-A  | 237,6 ± 3,3  | 0,169 ± 0,015 | -42,1 ± 0,5 | 5,50 ± 0,40                                             | 74,0 ± 0,1 | 8,3 ± 0,1 |
| NLC-CP2    | 227,1 ± 2,3  | 0,184 ± 0,034 | -26,9 ± 0,3 | 7,30 ± 0,17                                             | -          | -         |
| NLC-CO1-A  | 256,4 ± 0,2  | 0,200 ± 0,009 | -43,7 ± 0,6 | 4,28 ± 0,76                                             | 75,8 ± 0,1 | 8,5 ± 0,1 |
| NLC-CO1    | 220,9 ± 0,1  | 0,131 ± 0,012 | -33,0 ± 0,5 | 4,80 ± 0,52                                             | -          | -         |
| NLC-CO2-A  | 217,7 ± 0,8  | 0,174 ± 0,004 | -40,2 ± 1,1 | 8,14 ± 0,71                                             | 78,4 ± 0,1 | 8,8 ± 0,1 |
| NLC-CO2    | 206,9 ± 1,0  | 0,161 ± 0,007 | -23,7 ± 0,3 | 6,15 ± 0,81                                             | -          | -         |
| NLC-OO1-A  | 254,1 ± 1,8  | 0,190 ± 0,005 | -42,2 ± 0,5 | 5,34 ± 0,80                                             | 72,2 ± 0,3 | 8,1 ± 0,1 |
| NLC-OO1    | 236,4 ± 0,5  | 0,163 ± 0,030 | -31,5 ± 0,7 | 6,08 ± 0,70                                             | -          | -         |
| NLC-OO2-A  | 243,3 ± 5,8  | 0,176 ± 0,022 | -49,7 ± 0,7 | 8,85 ± 0,13                                             | 74,9 ± 0,1 | 8,3 ± 0,1 |
| NLC-OO2    | 225,7 ± 0,6  | 0,205 ± 0,022 | -26,5 ± 0,1 | 4,90 ± 0,21                                             | -          | -         |

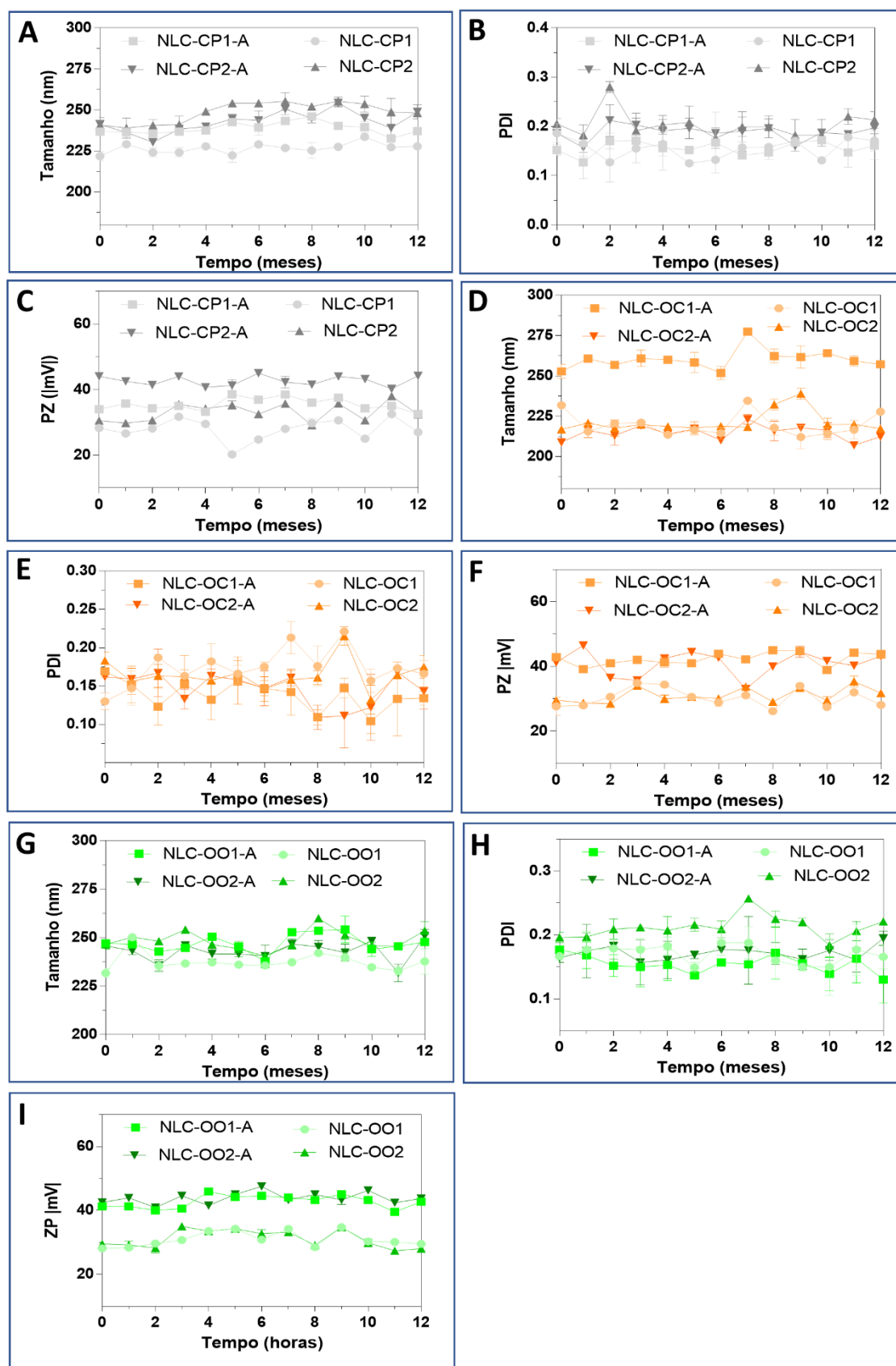
Em relação às formulações com lipídios sintéticos, não houve grande diferença nas formulações com e sem ATC, no que diz respeito ao tamanho das partículas e PDI. Nestas formulações a %EE de ATC foi ligeiramente maior na formulação com surfactante P68 (NLC-CP1-A).

As formulações compostas por lipídios naturais apresentaram tamanhos de partículas similares entre si, levando-se em consideração o erro experimental envolvido na técnica de DLS. As amostras sem fármaco mostram tamanho de partículas ligeiramente menor que as com ATC. Todas estas formulações apresentaram valores de PDI e PZ ideais, este último aumentado na presença de ATC. A eficiência de encapsulação não variou com a mudança do surfactante.

A eficiência de encapsulação variou de 66,8 a 74,8% (Tabela 23), considerada alta e que reflete a utilização da ATC na sua forma neutra, de maior solubilidade na fase lipídica, favorecendo a encapsulação. Os valores de %EE são próximos aos obtidos com LDC (70-80%), um anestésico com propriedades físico-químicas similares, encapsulada em NLC preparadas com excipientes sintéticos e naturais (RIBEIRO et al., 2016, 2017). Da mesma forma os resultados de capacidade de carregamento (DL >8%) foram semelhantes à de outros AL amino-amida encapsulados em NLC relatados na literatura (RIBEIRO et al., 2017; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017).

### **3.5 Estabilidade Física**

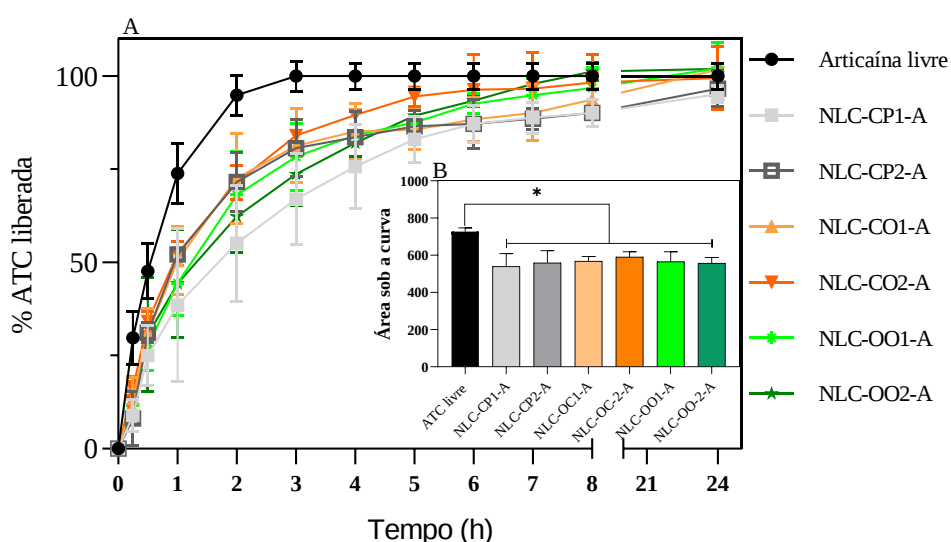
A estabilidade física das formulações de NLC foi monitorada durante 12 meses, na temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) e ambiente com umidade de  $60 \pm 5\%$  (RODRIGUES DA SILVA et al., 2017). Os parâmetros analisados foram o tamanho das nanopartículas (nm), PDI e PZ (|-mV|) como apresentado na Figura 29. Os dados encontrados mostram que, em até 360 dias, as formulações estudadas não apresentaram diferença significativa nos parâmetros analisados, em relação a medida inicial.



**Figura 29.** Estabilidade física das formulações escolhidas e seus controles: alterações de tamanho (A, D, G), PDI (B, E, H) e potencial zeta (PZ) (C, F, I) durante um ano de armazenamento, na temperatura ambiente. Adaptado de RODRIGUES DA SILVA et al., 2020).

### 3.6 Estudo de liberação *in vitro*

O experimento de liberação *in vitro* é um teste comum usado para avaliar a cinética da liberação de fármacos a partir de NLC (RIBEIRO et al., 2016). A Figura 30A mostra os resultados da cinética de liberação *in vitro* de ATC, livre ou encapsulada nas NLC. O equilíbrio da ATC em solução (ATC livre) entre os compartimentos doador e receptor das células de Franz foi alcançado em menos de 3 h, similar ao observado anteriormente para outros AL hidrofílicos, como LDC e prilocaína (RIBEIRO et al., 2016). Todas as formulações de NLC estudadas exibiram uma liberação rápida inicial, semelhante à observada com o ATC livre, até 30% da liberação do fármaco. Depois disso, as NLC promoveram uma liberação sustentada de ATC por até 8 h, quando praticamente todas as formulações atingiram o equilíbrio (100% de liberação). Assim, se compararmos os dados de área sob a curva obtidos com as diferentes formulações (Figura 30B), existe uma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) no período de 8 horas entre a ATC livre e encapsulada nas NLC, mostrando que uma cinética de liberação diferente entre ATC encapsulada e livre. Por tratamento matemático, o modelo de Weibull foi o mais adequado para ajuste das curvas das seis formulações (Tabela 24). O perfil de liberação da fase inicial de liberação a partir das NLC (até 30%) foi rápido como o do fármaco livre, seguindo-se liberação mais lenta da ATC, das nanopartículas para a fase aquosa. Apesar da falta de diferenças significativas entre as seis formulações de NLC-ATC em relação à cinética da liberação *in vitro* (*inset* da Fig. 30 – gráfico de área sob a curva), notamos que a liberação da ATC encapsulada nas formulações (100% em 8 h) foi mais rápida do que a observada para LDC em NLC (14 h, RIBEIRO et al., 2016, 2017), confirmando o caráter hidrofílico da ATC.



**Figura 30.** Cinética de liberação *in vitro*. **A**, curvas de articaína (% ATC) liberada em função do tempo, a partir do fármaco livre ou encapsulado nas 6 formulações de NLC. **B**, Valores calculados das áreas sob as curvas obtidas das curvas em A, até o tempo de 8 horas. (n=6), 37 °C. \*  $p < 0,05$ ; teste T. Adaptado de RODRIGUES DA SILVA et al., 2020.

**Tabela 24.** Resultados de  $R^2$  (coeficiente de determinação) dos modelos matemáticos aplicados aos resultados das amostras dos testes de cinética de liberação, obtidos com o software de análises KinectDS3.

| Modelo<br>/<br>amostra | Ordem 0 | 1ª<br>ordem | Korsmeyer-<br>Peppas | Weibull | Hixson-<br>Crowell | Higuchi |
|------------------------|---------|-------------|----------------------|---------|--------------------|---------|
| Articaína livre        | 0.2353  | 0.0663      | 0.9804               | 0.9937  | 0.1476             | -2.2212 |
| NLC-CP1                | 0.4798  | 0.0842      | 0.9896               | 0.9975  | 0.2811             | -1.1989 |
| NLC-CP2                | 0.3909  | 0.0806      | 0.9878               | 0.9967  | 0.2326             | -1.4958 |
| NLC-CO1                | 0.391   | 0.0784      | 0.9867               | 0.9969  | 0.2285             | -1.5025 |
| NLC-CO2                | 0.3588  | 0.0769      | 0.9859               | 0.9983  | 0.2168             | -1.5389 |
| NLC-OO1                | 0.4059  | 0.07992     | 0.9871               | 0.9980  | 0.2423             | -1.3726 |
| NLC-OO2                | 0.4148  | 0.0806      | 0.9880               | 0.9950  | 0.2497             | -1.3247 |

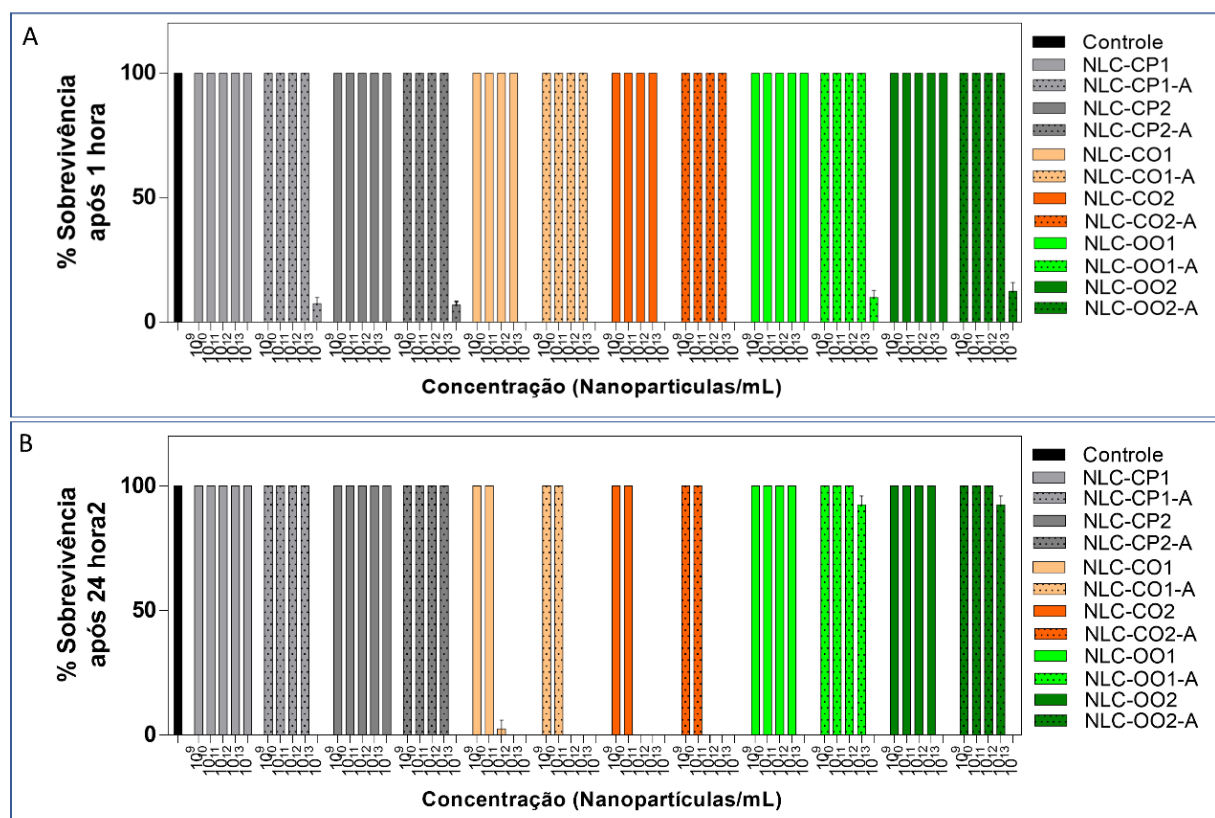
### 3.7 Testes em peixe-zebra

Todas as formulações otimizadas desenvolvidas para ATC apresentaram propriedades físico-químicas desejáveis, estabilidade por um ano e perfil de liberação comparável. Embora o planejamento fatorial e a liberação *in vitro* sejam ferramentas essenciais no desenvolvimento de farmacêutico, elas não foram úteis na escolha de uma melhor formulação, já que todas as apresentaram características desejáveis, dentro do proposto.

Assim, neste trabalho, o uso de um modelo alternativo (Zebrafish) ao de roedores e que permite a análise de um número grande de formulações durante a fase de desenvolvimento das nanopartículas foi extremamente útil (GIANNACCINI et al., 2014) durante o desenvolvimento farmacêutico, para prever as respostas biológicas *in vivo*.

O modelo de peixe-zebra (Zebrafish, *Danio rerio*) vem ganhando destaque na pesquisa farmacológica, por exemplo na avaliação da toxicidade de fármacos (HUITING; LAROCHE; FENG, 2015; MACRAE; PETERSON, 2015), por possuir características notáveis: o grande número de ovos por cria (cerca de 200 ovos/ninhada), permitindo realizar todas as análises com um alto número de espécimes por ponto (estatística robusta); a transparência dos embriões e larvas precoces, que associada à existência de linhas transgênicas (nas quais tipos ou tecidos específicos de células são marcados por fluorescência) permite monitorar processos específicos *in vivo*, em todo o organismo (SIEBER et al., 2017). Além disso, é importante ressaltar que, durante o período larval, todos os órgãos e sistemas do peixe-zebra são funcionais, tornando os indivíduos fisiologicamente equivalentes aos animais adultos (ULLOA et al., 2016). Finalmente, o sistema imunológico do *Danio rerio* é semelhante ao de mamíferos, tanto em nível molecular como celular (FORN-CUNÍ et al., 2017). Assim, devido a estes aspectos, optamos por realizar testes em modelo de peixe-zebra nos NLC otimizados, a fim de selecionar a melhor formulação para os testes em roedores.

Inicialmente determinamos a concentração de trabalho das formulações de NLC, definida como a concentração mais alta que não induzia a morte ou efeitos fenotípicos no corpo das larvas de 5 dias pós fertilização (dpf). 1 hora após a incubação (hpi), apenas as formulações NLC-CO1 e NLC-CO2 causaram mortalidade, na concentração de  $10^{13}$  nanopartículas.mL<sup>-1</sup>. Assim, por padronização, foi adotada a concentração de segurança de  $10^{12}$  nanopartículas.mL<sup>-1</sup> para todas as formulações estudadas sem ATC, pois não induziu mortalidade nem efeitos fenotípicos no corpo das larvas (Figura 31A). Mesmo com os NLC contendo ATC em concentrações de até 1 mM (cerca de  $10^{12}$  nanopartículas.mL<sup>-1</sup>) nenhuma morte ou alterações nas larvas foram registradas após 1 hpi (Figura 31A). Apenas para o teste de 24 hpi (absorção), a concentração de trabalho foi reduzida para  $10^{10}$  nanopartículas.mL<sup>-1</sup> devido a mortalidade causada após tratamento com NLC-CO1 e NLC-CO2 (Figura 31B).

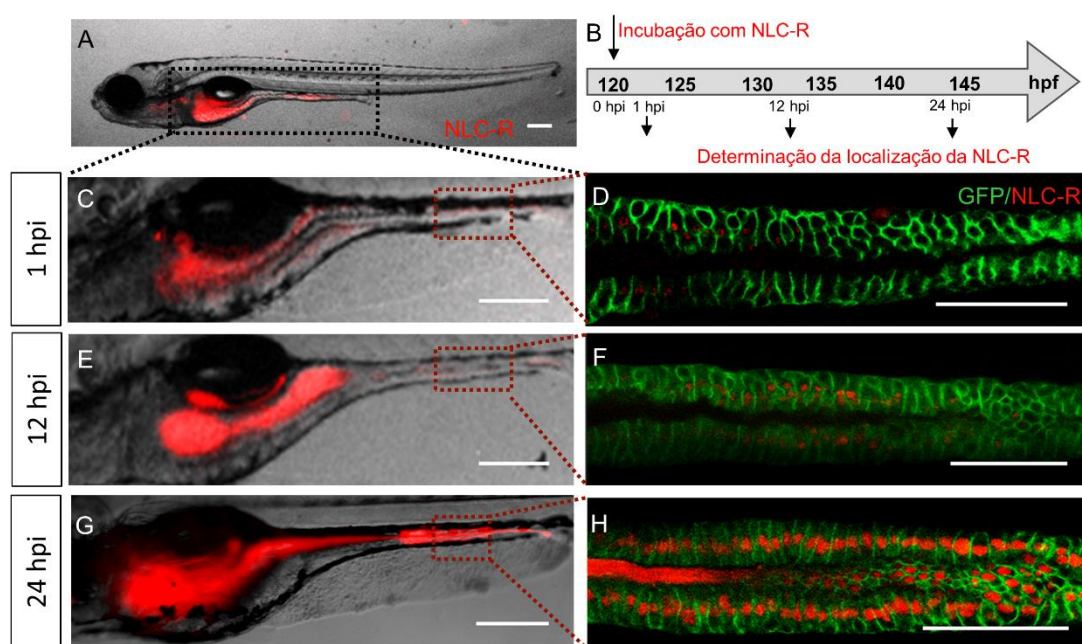


**Figura 31.** Sobrevivência (em %) das larvas de peixe-zebra após 1 **A** e **B** 24 horas de incubação as formulações testadas. Adaptado de RODRIGUES DA SILVA et al., 2020.

### 3.7.1 Absorção das NLC nas larvas de peixe-zebra

Para determinar a absorção dos NLC nas larvas, o acúmulo de NLC marcados com rodamina PE a 0,01% foi examinado em órgãos específicos de larvas WT com 5 dpf, nos tempos de 1, 12 e 24 hpi. Como observado na Figura 32, em todos os tempos analisados, os NLC fluorescentes (NLC-R) foram observados, principalmente no trato gastrointestinal. O sinal

fluorescente vermelho foi mais intenso em 24 hpi, indicando que o acúmulo é tempo dependente (Figuras 32 C, E, G). Para verificar se os NLC estavam presentes no lúmen intestinal ou foram absorvidos pelo epitélio da mucosa, aproveitamos a linha transgênica TgBAC (cldn15la: GFP)<sup>pd1034</sup>, na qual a membrana plasmática dos enterócitos é marcada com verde fluorescente. Assim, incubamos as larvas transgênicas de 5 dpf com os NLC marcados com rodamina, e os resultados nas Figuras 32D, 32F e 32H confirmaram que as nanopartículas foram de fato internalizadas pelas células epiteliais, de maneira dependente do tempo. Esses resultados estão de acordo com relatos anteriores que indicam que as camadas epiteliais são uma rota importante para a absorção de partículas pelas larvas do peixe-zebra (CONNOLLY et al., 2016; JANG et al., 2014; VAN POMEREN et al., 2017). Além disso, estes resultados estão em concordância com os observados em nanopartículas de poliestireno maiores que 200 nm, absorvidas oralmente pelas larvas de peixe-zebra (VAN POMEREN et al., 2017). Esses autores também demonstraram que apenas nanopartículas menores que 50 nm foram absorvidas pela epiderme.



**Figura 32.** Absorção dos NLC no corpo larval. **A**, Estratégia experimental. Larvas de 5dpf, WT ou TgBAC(cldn15la: GFP)<sup>pd1034</sup> foram expostas a NLC carregados com rodamina PE (NLC-R) pelo método de imersão. **B**, A fluorescência foi monitorizada 1, 12 e 24 horas após a incubação (hpi). O intestino é marcado com uma linha pontilhada preta. Imagens representativas de larvas WT examinadas sob um estereomicroscópio de fluorescência a: **C**, 1 hpi, **E**, 12 hpi e **G**, 24 hpi. Uma região do intestino médio das larvas de TgBAC (cldn15la: GFP)<sup>pd1034</sup>, marcada por uma linha pontilhada vermelha em **C**, **E**, **G** e foi examinada ao microscópio confocal (**D**, **F**, **H**) a 1, 12 e 24 hpi. Barra de escala = 200 mm. Adaptado de RODRIGUES DA SILVA et al., 2020.

### 3.7.2 Atividade anti-inflamatória dos excipientes dos NLC

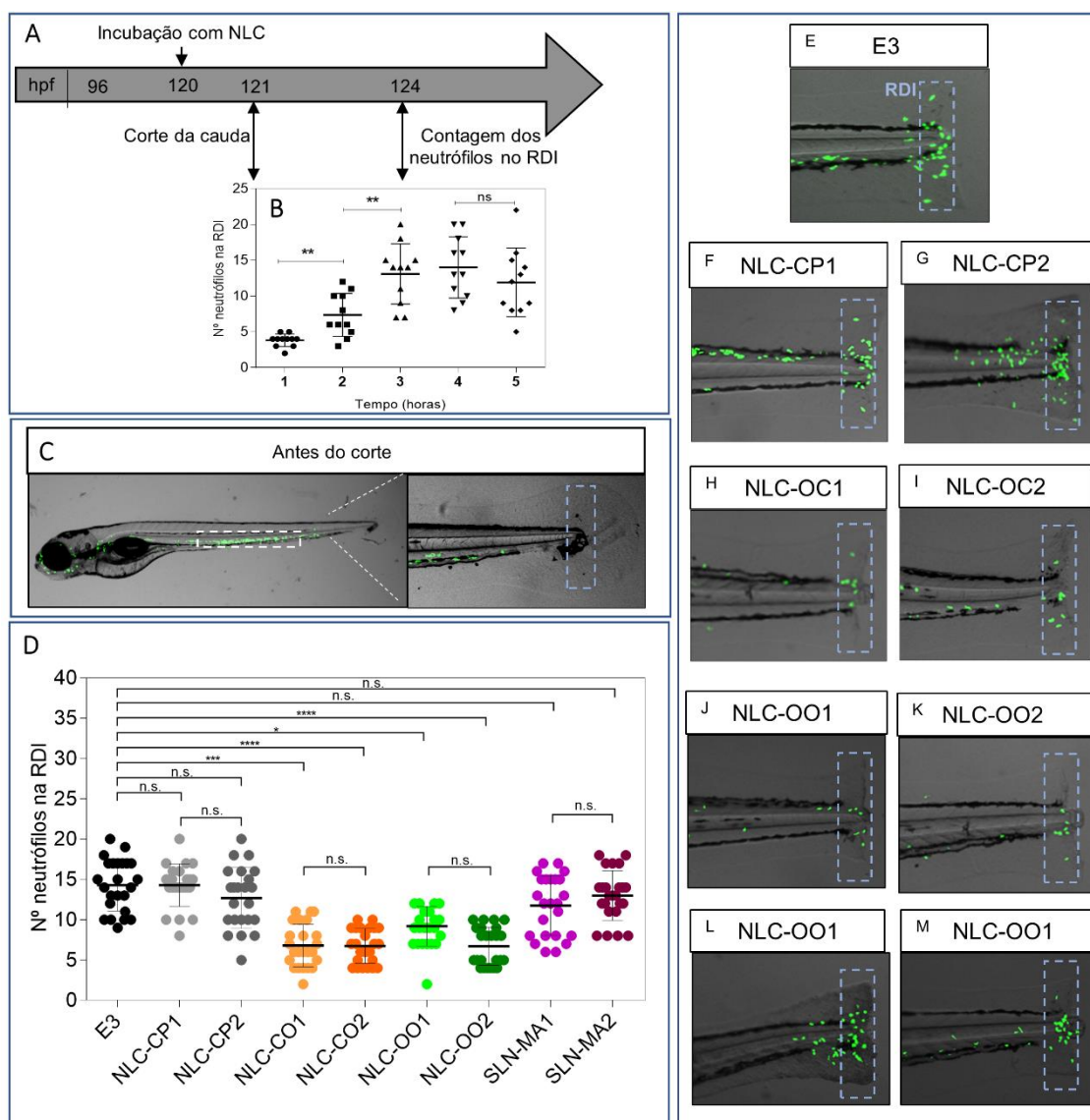
A primeira questão avaliada com o modelo peixe-zebra foi se a funcionalização das nanopartículas com excipientes anti-inflamatórios seria efetiva *in vivo*, nas concentrações

utilizadas. Apesar de os excipientes escolhidos já possuírem atividade anti-inflamatória quando isolados, pretendíamos verificar se essa atividade seria mantida, quando incorporados nas NLC.

Assim, utilizando larvas transgênicas específicas, com neutrófilos fluorescentes (já que o neutrófilo é um dos marcadores de um processo inflamatório), pudemos acompanhar *in vivo* a migração neutrófilos para uma área lesionada. Para isso incubamos larvas de peixe-zebra com as NLC e, em seguida, fizemos uma lesão na cauda das larvas. Sob condições homeostáticas os neutrófilos estão retidos no tecido hematopoiético caudal (CHT) das larvas e apenas uma pequena fração está presente no sangue periférico. Após estímulo nocivo, uma resposta inflamatória é desencadeada e a fração de neutrófilos fora do CHT aumenta rapidamente (GALDAMES et al., 2014; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; ZUÑIGA-TRASLAVIÑA et al., 2017), podendo ser quantificada. Como controle deste processo, larvas sem tratamento foram testadas e a Figura 33B mostra o aumento da migração de neutrófilos para a região de interesse (RDI, Figura 33E) durante as primeiras horas após lesão causada nas larvas. Vê-se que o pico da migração ocorreu após 3 horas da lesão causada, tempo escolhido para realização da contagem de neutrófilos e teste das formulações, considerando-se indicativo de atividade anti-inflamatória a diminuição da migração celular dos neutrófilos ocasionada pela incubação com os NLC.

Os resultados obtidos para o grupo controle mostraram uma média de 15 neutrófilos infiltrados na zona lesada (Figuras 33D, 33E). Não houve diferença significativa nas larvas tratadas com NLC-CP1 e NLC-CP2, nas quais uma média de 15 e 13 neutrófilos na área afetada foram observados respectivamente (Figuras 33B, F, G). Já nas larvas tratadas com NLC-CO1, NLC-CO2, NLC-OO2 e NLC-OO1 o número de neutrófilos na lesão foi significativamente menor: uma média de 6 (NLC-CO1, NLC-CO2 e NLC -OO2) e 8 neutrófilos (NLC-OO1), como mostrado nas Figuras 33D, H, I, J, K. Cabe ressaltar ainda que nanopartículas preparadas somente com o lipídio sólido manteiga de abacate (SLN-MA1 e SLN-MA2) também não apresentaram diferença significativa na migração de neutrófilos, em relação ao controle (Figura 33D, L, M).

Esses resultados demonstraram que os NLC preparados com óleos de copaíba ou oliva têm um efeito anti-inflamatório significativo, em concordância com a literatura. De fato, experimentos anteriores em roedores, que usavam uma lesão no córtex motor como modelo inflamatório mostraram diminuição na migração de neutrófilos quando os animais foram tratados com óleo de copaíba (GUIMARÃES-SANTOS et al., 2012). No caso do óleo de oliva, o recrutamento de leucócitos foi profundamente inibida durante um teste de inflamação induzido por lipopolissacarídeos, em camundongos (BUSCHMANN et al., 2015).



**Figura 33.** Atividade anti-inflamatória dos NLC em larvas de peixe-zebra. **A**, representação da estratégia experimental; **B**, gráfico representativo do aumento de neutrófilos na zona lesionada em função do tempo. **C**, Imagens representativas de larva Tg (*BACmpx:GFP*)<sup>i114</sup> e de sua cauda, antes do corte. **D**, Quantificação de neutrófilos na área lesionada (região de interesse, RDI) após 3 horas pós lesão (hpl). Imagens representativas da área lesionada de larvas sem tratamento **E**, ou tratadas com os diferentes NLC (**F-M**). Análise estatística: one-way ANOVA com Tukey post-hoc test. Significância estatística: \*\*\*\*p < 0,0001; \*\*\*p < 0,001; n.s. = não significativo. Adaptado de RODRIGUES DA SILVA et al., 2020.

Embora o teste acima tenha sido capaz de responder à pergunta sobre a efetividade da funcionalização das nanopartículas, ele também não permitiu selecionar a melhor formulação, pois todos os NLC funcionais (NLC-CO1, NLC-CO2, NLC-OO1 e NLC-OO2) exerceram um efeito anti-inflamatório. Além disso, as formulações que diferiram na composição apenas pelo surfactante (NLC-CP1 (P68) vs. NLC-CP2 (T80) e NLC-OO1 (P68) vs. NLC-OO2 (T80)) apresentaram atividade anti-inflamatória equivalente.

### 3.7.3 *Triagem in vivo do efeito da articaína encapsulada em NLC*

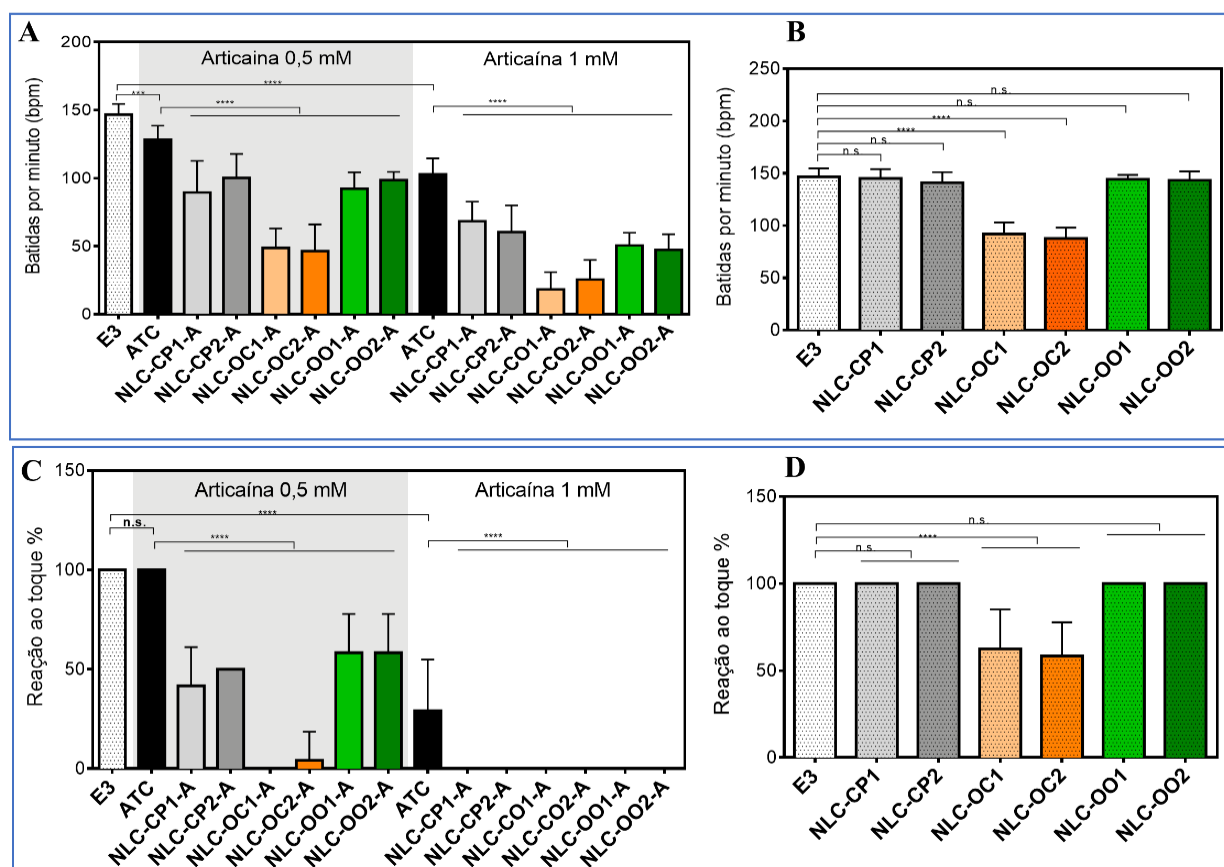
O modelo peixe-zebra apresenta ainda outra vantagem que é o fácil acesso à função cardíaca. Esta função é bastante útil no estudo da atividade de AL, que promovem bradicardia pelo bloqueio de canais voltagem-dependentes, de cardiomiócitos (MCCANN, 2000). O efeito da bradicardia no peixe-zebra tem sido utilizado para avaliar a atividade anestésica de diferentes compostos como LDC, propofol e isoflurano (PYLATIUK et al., 2014). É interessante notar que o efeito anestésico observado é sempre sistêmico (apesar da ATC ser um AL), pois o medicamento é administrado na água de banho das larvas (LETAMENDIA et al., 2012). Pelo mesmo raciocínio, o efeito do AL nas membranas excitáveis do sistema nervoso central pode ser avaliado através do teste de resposta ao toque (COLLYMORE et al., 2014; GUO et al., 2015).

### 3.7.4 *Bradicardia e anestesia*

Como mostrado na Figura 34A, as larvas de 5 dpf incubadas em meio E3 mostraram uma média de 150 batimentos por minuto (bpm), consistente com relatos anteriores (DE LUCA et al., 2014). As duas concentrações (0,5 e 1,0 mM) de ATC livre, após 1 hora de incubação, diminuíram significativamente a frequência cardíaca em comparação com as larvas controle, para 130 bpm e 100 bpm, respectivamente. Os NLC sintéticos (NLC-CP1-A e NLC-CP2-A) e os produzidos com óleo de oliva (NLC-OO1-A e NLC-OO2-A) aumentaram (> 30%) a bradicardia em relação ao ATC livre nas duas concentrações testadas, sugerindo que o encapsulamento potencializa o efeito anestésico do ATC, como já observado com LDC (RIBEIRO et al., 2017). Nos NLC a base de copaíba (NLC-CO1-A e NLC-CO2-A) o efeito de bradicardia foi ainda maior (> 60% em comparação ao da ATC livre) nas concentrações testadas (Figura 34A). Os NLC controles (sem ATC) não afetaram os batimentos cardíacos, exceto aqueles compostos por óleo de copaíba, que reduziram os batimentos cardíacos para 92 e 88 bpm, respectivamente (NLC-CO1, NLC-CO2; Figura 34B).

Em relação à resposta ao toque (que evidenciaria alterações no sistema nervoso central, SNC), a ATC livre diminuiu a resposta das larvas apenas na concentração mais alta testada: 1 mM (Figura 34C), de acordo com relatos anteriores, para LDC (VALENTIM et al., 2016). Nas formulações ATC encapsulada em NLC, a diminuição na resposta ao toque foi observada já na concentração de 0,5 mM, nos NLC preparados com lipídios sintéticos (NLC-CP1-A e NLC-CP2-A) e nos compostos com óleo de oliva (NLC-OO1-A e NLC-OO2-A), evidenciando potencialização de 50% em relação à ATC livre. Nesta mesma concentração (0,5 mM), os NLC compostos por óleo de copaíba (NLC-CO1-A, NLC-CO2-A) exibiram efeito ainda mais pronunciado sobre o SNC, induzindo 100% de anestesia nas larvas. Como observado para o efeito da bradicardia, as formulações de NLC controle com óleo de copaíba (NLC-CO1, NLC-CO2;

Figura 34D) exibiram algum efeito anestésico, confirmando que o óleo de copaíba exerceu um efeito antinociceptivo sinérgico ao da ATC.



**Figura 34.** Bradicardia após 1 hora de incubação de articaina livre (ATC) ou articaina em carregadores lipídicos nanoestruturados nas concentrações de 0,5 e 1 mM **A**, e seus respectivos controles sem articaina **B**. Reação ao toque após 1 hora de incubação de ATC e carregadores lipídicos nanoestruturados carregados com articaina em concentrações de 0,5 e 1 mM **C**, e seus respectivos controles sem articaina **D**. Análise estatística: one-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey. Significância estatística: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . E3, apenas meio: sem tratamento (controle). Adaptado de RODRIGUES DA SILVA et al., 2020.

É comum na prática médica usar o anestésico LDC (administrado por via intravenosa ou intramuscular) em concentrações precisas, como agente antiarrítmico (MARTÍ-CARVAJAL et al., 2015) devido a sua atividade vasodilatadora e depressora na contratilidade miocárdica (MCCANN, 2000; SINNOTT; STRICHARTZ, 2003). Em muitos aspectos, a fisiologia do coração do peixe-zebra é semelhante à do coração humano (NEMTSAS et al., 2010), de modo que, assim como a LDC (PYLATIUK et al., 2014) a ATC livre causou depressão nos batimentos cardíacos das larvas de peixe-zebra (bradicardia). Além disso, quando encapsulada em NLC, a ATC promoveu bradicardia mais profunda em relação à sua forma livre, sugerindo uma melhora na administração do medicamento e uma potencialização de sua atividade anestésica, como já relatado para a LDC (GUILHERME et al., 2017).

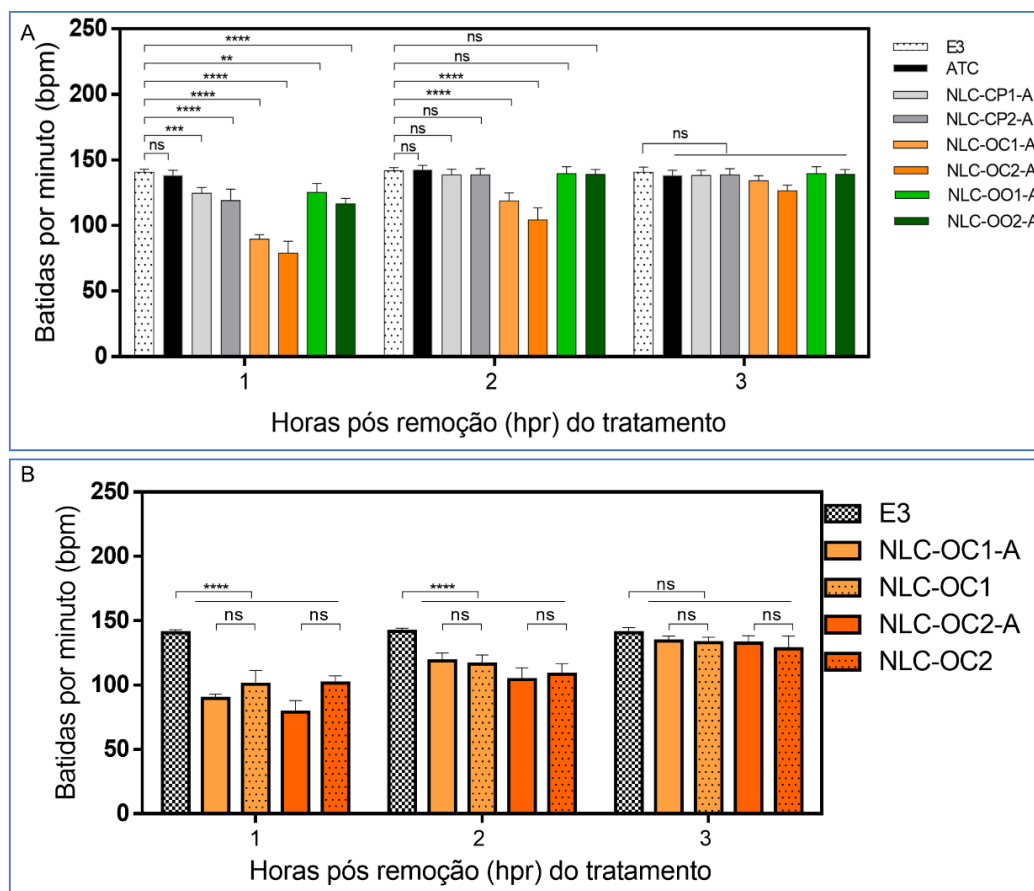
O óleo de copaíba presente nos NLC controle também foi capaz de induzir bradicardia e anestesia adjuvante no SNC. Esse resultado está de acordo com a literatura, que relata que o óleo de copaíba atua em receptores opióides (GOMES et al., 2007), explicando os efeitos depressores sobre o miocárdio e células nervosas. Potenciação semelhante do efeito anestésico foi observada quando outros fármacos foram co-encapsulados com AL (por exemplo: tetrodotoxina, saxitoxina e dexametazona) (SANTAMARIA et al., 2017). Outro resultado interessante foi que, independentemente do surfactante usado para preparar os NLC de óleo de copaíba, sua resposta biológica não mudou.

### 3.7.5 Recuperação da bradicardia

Como o teste *in vitro* de liberação evidenciou a liberação prolongada da ATC pelos NLC, medimos o tempo de recuperação da bradicardia para verificar se a encapsulação da ATC foi capaz de prolongar esse efeito depressor. Para isso, larvas de 5 dpf foram expostas a ATC 1 mM (dose para o mais alto efeito de bradicardia, observado na Figura 34), livre ou encapsulada nas nos NLC. Após 1 hora, o meio foi removido e substituído por um puro (E3) e a taxa de batimentos cardíacos foi analisada em 1, 2 ou 3 horas após a remoção da ATC (hpr). Em 1 hpr, as larvas incubadas com ATC livre retornaram à taxa de batimentos cardíacos basais (Figura 35A), enquanto as larvas tratadas com ATC encapsulada em NLC ainda exibiam bradicardia. Em 2 hpr, apenas nos NLC-CO1 e NLC-CO2 a taxa de batimentos cardíacos ainda era significativamente reduzida: 120 bpm e 100 bpm, respectivamente. Em 3 hpr, todos os tratamentos perderam o efeito da bradicardia. Estes resultados *in vivo* estão de acordo com os experimentos de cinética de liberação *in vitro*, confirmando que os NLC prolongam o efeito do ATC.

A Figura 35B destaca os resultados obtidos com NLC compostos de óleo de copaíba, com e sem ATC. Neste caso, ao contrário do observado com as outras formulações de NLC, o efeito de bradicardia ultrapassou 2 hpr, possivelmente devido ao efeito do óleo de copaíba nos receptores opióides (GOMES et al., 2007), conforme evidenciado pela bradicardia prolongada observada com NLC controle, sem ATC (NLC-CO1 e NLC-CO2). Além disso, após 1 hpr, os efeitos de bradicardia de NLC-CO1-A e NLC-CO2-A foram apenas 2 e 7% maiores do que NLC sem ATC (NLC-CO1 e NLC-CO2, respectivamente). Portanto, o efeito da bradicardia do óleo de copaíba parece prevalecer sobre o da ATC. Mais uma vez, não foram encontradas diferenças significativas entre os NLC que diferem em sua composição apenas pelo surfactante (NLC-CP1 (P68) vs. NLC-CP2 (T80) e NLC-OO1 (P68) vs. NLC-OO2 (T80)). Embora a literatura indique que os surfactantes Pluronic aumentam o tempo de circulação de NLC *in vivo*, reduzindo por impedimento estérico a ação das lipases do sangue sobre seus constituintes lipídicos (GÖPPERT;

MÜLLER, 2005), neste trabalho não observamos diferenças entre os dois surfactantes testados (Tween 80 e Pluronic F68) em qualquer das respostas medidas *in vivo*, no peixe-zebra.



**Figura 35.** Recuperação da bradicardia. **A**, Batimentos cardíacos contados após 1, 2 e 3 horas após remoção do tratamento (hpr) com diferentes formulações de NLC com 1 mM de articaína. **B**, Comparação do efeito das formulações de óleo de copaíba-NLC, com e sem articaína no batimento cardíaco. Análise estatística realizada por one-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey. Significância estatística: \*\*\*\* p < 0,0001; n.s.= não significativo. Adaptado de RODRIGUES DA SILVA et al., 2020.

### 3.8 Seleção das formulações

No desenvolvimento dos NLC, realizamos a otimização e caracterização físico-química das formulações e, através de forma inovadora, vários testes em peixe-zebra para selecionar a melhor composição para a aplicação desejada. A Tabela 25 resume as informações encontradas para as formulações estudadas.

**Tabela 25.** Propriedades físico-químicas e respostas biológicas das formulações de NLC desenvolvidas para articaína. Tamanho = diâmetro das nanopartículas, em nm; PDI = índice de polidispersão, PZ = potencial zeta, em mV, %EE = eficiência de encapsulação de articaína, bpm = batimentos cardíacos por minuto, em peixe-zebra.

| Formulação | Propriedades físico-químicas |                   |                 |                | Respostas biológicas          |                                         |                                      |                                                |
|------------|------------------------------|-------------------|-----------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|
|            | Tamanho (nm)                 | PDI               | PZ (mV)         | %EE            | Propriedade anti-inflamatória | Bradicardia (bpm $\pm$ DP) <sup>a</sup> | Tempo recuperação da bradicardia (h) | Melhora na anestesia (% $\pm$ DP) <sup>b</sup> |
| NLC-CP1-A  | 237,0 $\pm$ 0,4              | 0,167 $\pm$ 0,001 | -38,3 $\pm$ 0,5 | 74,8 $\pm$ 1,2 | Não                           | 68 $\pm$ 4                              | 2                                    | 58 $\pm$ 6                                     |
| NLC-CP2-A  | 237,6 $\pm$ 3,3              | 0,169 $\pm$ 0,015 | -42,1 $\pm$ 0,5 | 66,8 $\pm$ 2,3 | Não                           | 60 $\pm$ 6                              | 2                                    | 50 $\pm$ 0                                     |
| NLC-CO1-A  | 256,4 $\pm$ 0,2              | 0,200 $\pm$ 0,009 | -43,7 $\pm$ 0,6 | 70,5 $\pm$ 1,4 | Sim                           | 18 $\pm$ 3                              | 3                                    | 100 $\pm$ 0                                    |
| NLC-CO2-A  | 217,7 $\pm$ 0,8              | 0,174 $\pm$ 0,004 | -40,2 $\pm$ 1,1 | 70,6 $\pm$ 1,8 | Sim                           | 25 $\pm$ 4                              | 3                                    | 100 $\pm$ 4                                    |
| NLC-OO1-A  | 254,1 $\pm$ 1,8              | 0,190 $\pm$ 0,005 | -42,2 $\pm$ 0,5 | 68,3 $\pm$ 1,9 | Sim                           | 50 $\pm$ 3                              | 2                                    | 54 $\pm$ 6                                     |
| NLC-OO1-A  | 243,3 $\pm$ 5,8              | 0,176 $\pm$ 0,022 | -49,7 $\pm$ 0,7 | 68,0 $\pm$ 2,5 | Sim                           | 47 $\pm$ 3                              | 2                                    | 54 $\pm$ 6                                     |

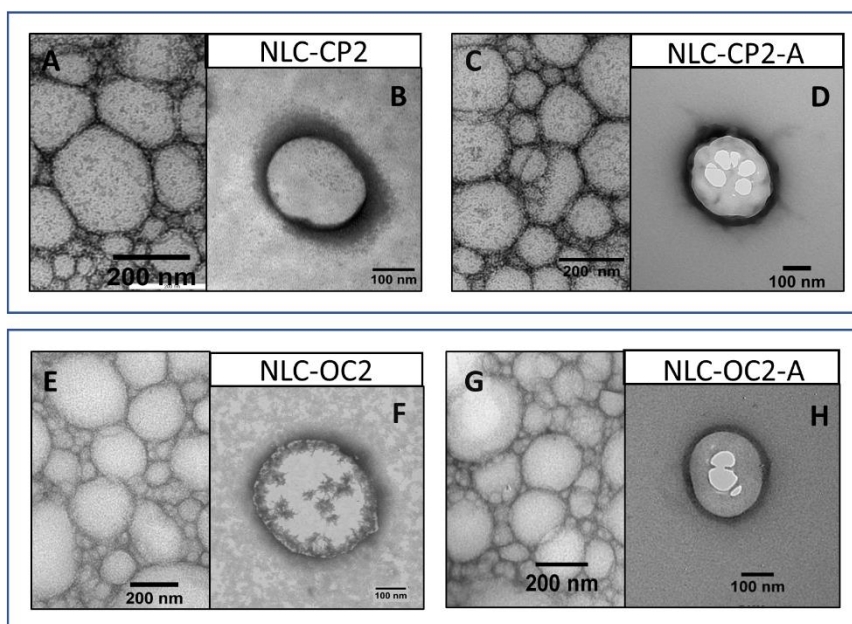
<sup>a</sup> concentração de ATC igual a 1 mM; <sup>b</sup> em relação a ATC a 0,5 mM.

Dentre as formulações, aquelas com as melhores propriedades biológicas foram os NLC preparados com óleo de copaíba, dada sua atividade anti-inflamatória e maior potência anestésica. Essas formulações (NLC-CO1-A e NLC-CO2-A) diferem entre si pelo surfactante empregado: Pluronic F68 ou Tween 80, respectivamente. Entre estes dois surfactantes, não foram detectadas diferenças estatísticas nos efeitos biológicos provocados pelas formulações *in vivo*. Portanto, para selecionar uma, consideramos as propriedades físico-químicas de formulações e surfactantes. A formulação produzida com Tween 80 exibiu partículas de tamanho menores e PDI mais baixo, o que a literatura indica como melhores parâmetros para a administração parenteral, que é nosso objetivo. Além disso, o Tween 80 é mais barato que o P68, favorecendo sua futura produção e comercialização. Nesse sentido, a formulação composta com óleo de copaíba e Tween 80 (NLC-CO2-A) foi selecionada como a melhor para o prosseguimento deste trabalho. Portanto, o acoplamento do planejamento experimental ao modelo de peixe-zebra trouxe a possibilidade, durante a fase de desenvolvimento das NLC, de prever respostas biológicas, evitando futuras perdas de tempo e dinheiro.

### 3.9 Microscopia eletrônica de transmissão

Seguimos com a caracterização apenas da formulação de NLC-ATC selecionada, composta por óleo de copaíba (NLC-CO2-A) e como seu controle, a formulação composta de lipídios sintéticos (NLC-CP2-A).

A MET é uma técnica utilizada para determinar a morfologia e tamanho das nanopartículas (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018). As micrografias (Figura 36) revelaram NLC esféricas (Figuras 36B, D, E, G) com bordas definidas e tamanhos monodispersos (evidenciadas nas ampliações menores, na Figura 36A, C, D e F). Seus tamanhos foram medidos, utilizando o software ImageJ, apresentando tamanhos entre 150 a 300 nm. Essas medidas estão de acordo com as medidas de DLS e confirmaram a formação de nanopartículas pelo método de preparação utilizado (GUILHERME et al., 2017; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017).



**Figura 36.** Micrografias (microscopia eletrônica de transmissão) dos carreadores lipídicos nanoestruturados compostos por lipídios sintéticos, sem (NLC-CP2) e com articaína (NLC-CP2-A) e por lipídios naturais, a saber óleo de copaíba, sem (NLC-OC2) e com articaína (NLC-OC2-A). Magnificação: 27800x (A e C, E e G) e 100000x (B, D, F e G). Adaptado de RODRIGUES DA SILVA et al., 2020.

### 3.10 Calorimetria Diferencial de Varredura e difração de Raios-X

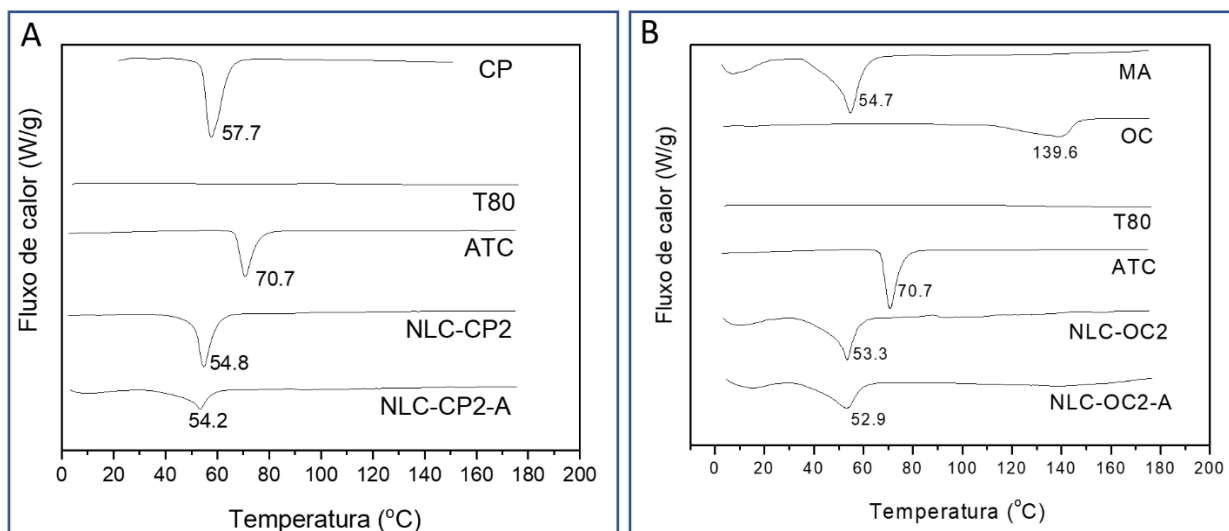
Desde as SLN, a cristalização dos lipídios sólidos que compõe as nanopartículas lipídicas é causa de preocupação no desenvolvimento desses DDS, por causar instabilidade do sistema, geralmente expulsando o fármaco encapsulado (MÄDER; MEHNERT, 2001). Assim, tem-se aplicado a associação das técnicas de DSC e DRX para estudar a estrutura cristalina dos NLC (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018). Além disso, através destas técnicas é possível, também, encontrar evidências da encapsulação dos fármacos (REIS et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016).

Mudanças no ponto de fusão e entalpia do lipídio sólido podem ser obtidas através da análise de DSC. A diminuição desta transição de fases indica menor cristalinidade do sistema. Assim, os resultados obtidos para a formulação de NLC sintético, cujo lipídio sólido é o palmitato

de cetila (CP) são apresentados na Figura 37A e os resultados da formulação de NLC natural (NLC-OC2, NLC-OC2-A), cujo lipídio sólido é a manteiga de abacate (MA) na Figura 37B. Os resultados do ponto de fusão e entalpia de cada amostra são mostrados na Tabela 26.

Na Figura 37A, vemos que CP apresentou um pico de fusão na temperatura de 57,7 °C com entalpia de 222 J/g. Nos NLC compostos por CP sem ATC (NLC-CP2), vê-se apenas um pico de transição em 54,8 °C. Como maior componente do NLC, e único que possui transição nesta faixa de temperatura, a diminuição na temperatura de transição encontrada, assim como da entalpia (121,8 J/g) indicam diminuição da cristalinidade do CP contido nos NLC. Este resultado já era esperado, conforme já relatado na literatura, quando se usa este lipídio como excipiente de NLC (RIBEIRO et al., 2016; RODRIGUES DA SILVA et al., 2017, 2020b). Em relação à ATC na forma básica, cuja fusão acontece em 70,7 °C (MELO et al., 2017), quando encapsulada em NLC sintético (NLC-CP2-A), nenhum evento exotérmico foi detectado, nesta temperatura. Porém, na transição do CP dessa amostra encontramos evento térmico diminuído (54,2 °C; 107,8 J/g) em relação ao NLC sem ATC (controle). Esses resultados são indicativos que a ATC está dissolvida no “core” lipídico dos NLC.

Nos NLC produzidos com lipídios naturais, a manteiga de abacate (MA) usada como lipídio sólido, mostrou uma transição exotérmica em 54,7 °C com entalpia de 57,8 J/g (Figura 37B e Tabela 26) quando pura. MA é uma mistura de vários ácidos graxos, cuja composição varia de acordo com o método de produção e local de cultivo da fruta (MOOZ et al., 2012). Transições em temperaturas altas da MA, como a encontrada aqui, sugerem a presença de uma maior quantidade de lipídios saturados em sua composição (YANTY; MARIKKAR; CHE MAN, 2013). Porém, o valor da entalpia foi baixo, indicando pouca cristalinidade desta manteiga. Já o óleo de copaíba (OC) puro apresentou discreto evento térmico em 139,6 °C, não observado quando nanoestruturado nas NLC-OC2, que apresentou uma única transição em 53,3 °C com 37,6 J/g de entalpia, relacionada a MA. Assim, como observado nos NLC sintético, houve uma diminuição da cristalinidade do componente lipídico majoritário (MA) quando formulado nas nanopartículas. Da mesma forma, a adição de ATC causou diminuição da temperatura de transição e entalpia (52,9 °C e 35,0 J/G), indicando encapsulação do fármaco.



**Figura 37.** Termogramas (DSC) obtidos com taxa de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ . **A**, palmitato de cetila puro (CP), Tween 80 (T80), Articaína base (ATC), Carreadores lipídicos nanoestruturados sintéticos sem (NLC-CP2) e com ATC (NLC-CP2-A) e **B**, manteiga de abacate pura (MA), óleo de copaíba puro (OC), T80, ATC, NLC com óleo de copaíba sem (NLC-OC2) e com ATC (NLC-OC2-A). Em cada gráfico, as escalas entre as amostras são iguais, para comparação.

**Tabela 26.** Temperatura de fusão e entalpia de fusão determinados por análise dos termogramas de DSC.

| Amostra                  | Temp. Fusão ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Entalpia ( $\text{J/g}$ ) |
|--------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Palmitato de cetila puro | 57,7                               | 222,0                     |
| Manteiga de abacate pura | 54,7                               | 57,8                      |
| Articaína forma básica   | 70,7                               | 111,6                     |
| Óleo de copaíba          | 139,6                              | 77,1                      |
| NLC-CP2                  | 54,8                               | 121,8                     |
| NLC-CP2-A                | 54,2                               | 107,8                     |
| NLC-OC2                  | 53,3                               | 37,6                      |
| NLC-OC2-A                | 52,9                               | 35,0                      |

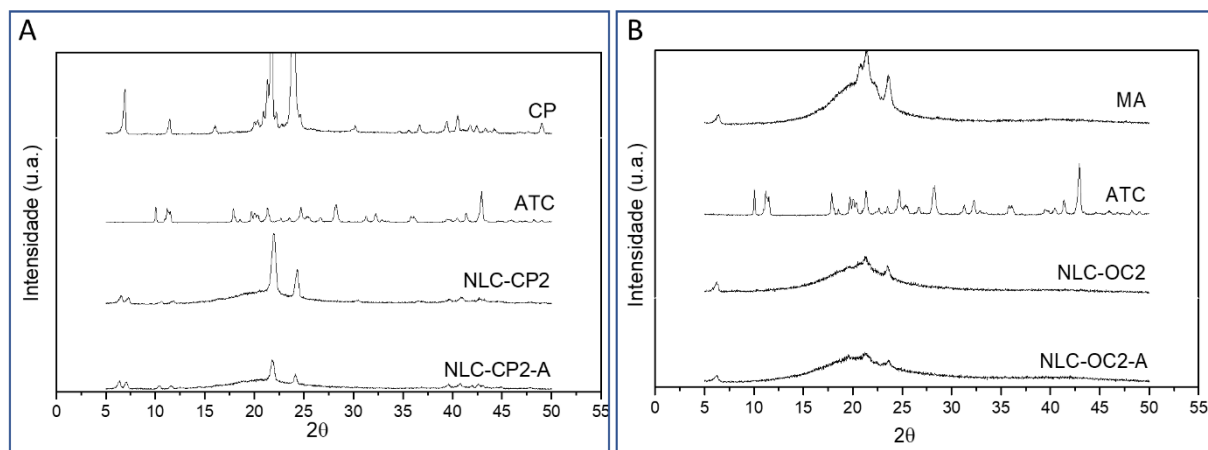
A difratometria de Raios-X é uma técnica que permite analisar a mudança no arranjo cristalino dos lipídios sólidos nas nanopartículas lipídicas (BUNJES, 2011). Na literatura duas informações podem ser obtidas através desta análise: se há formação de uma estrutura amorfa do lipídio sólido pela adição de lipídio líquido à formulação, evidenciada pela diminuição na intensidade e/ou aumento da largura dos picos; se há amorfização do fármaco, caracterizada pela ausência dos picos de difração de sua forma cristalina, indicando que o mesmo se encontra na matriz lipídica (GONZALEZ-MIRA et al., 2011; NEUPANE et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016).

A Figura 38A mostra o difratograma do palmitato de cetila puro, que apresentou picos intensos característicos em  $7^{\circ}$ ,  $11^{\circ}$ ,  $21^{\circ}$  e  $24^{\circ}$ , evidenciando alto grau de cristalinidade do lipídio puro, conforme relatado em literatura (RUKTANONCHAI et al., 2008). Estes picos diminuem de intensidade quando CP está inserido nas nanopartículas (NLC-CP2 e NLC-CP2-A), indicando que a adição de lipídio líquido e de ATC, amorfiza o palmitato de cetila, corroborando os dados de DSC. Nesta mesma Figura é apresentado o difratograma da ATC pura, com um pico de maior de

intensidade em 43° e diversos outros com menores, porém, equiparáveis intensidades em 28, 24, 21, 17, 11 e 10°. Estes picos não aparecem na amostra de NLC com ATC (NLC-CP2-A), um indicativo da encapsulação do fármaco, ou dissolução dele no interior lipídico dos NLC.

A Figura 38B apresenta o difratograma da manteiga de abacate pura, usada como lipídio sólido na formulação de NLC natural. MA puro apresentou picos intensos em 6, 23 e 21°, indicativos da presença de estrutura cristalina. Estes picos da MA, semelhantes aos observados em CP puro são indicativos de estrutura cristalina das cadeias acila destes lipídios sólidos (BUNJES; UNRUH, 2007; JENNING; GOHLA, 2000). Quando em NLC, as intensidades dos picos da MA sofrem grande diminuição, indicando um “core” lipídico pouco cristalino, também na NLC-OC2. Da mesma forma que na formulação sintética, picos de ATC não são detectáveis na amostra NLC-OC2-A, confirmando a inserção do anestésico no interior lipídico dos NLC.

Assim, para ambas as formulações selecionadas, as análises de DSC e XDR revelaram um interior lipídico de baixa cristalinidade, ideal para este tipo de carreador e compatível com a estabilidade de um ano, mensurada. Além disso, a alta eficiência de encapsulação de ATC (>70 %) nessas formulações, junto com os dados de DSC e XDR confirmam a presença de ATC no interior lipídico dos NLC otimizados.



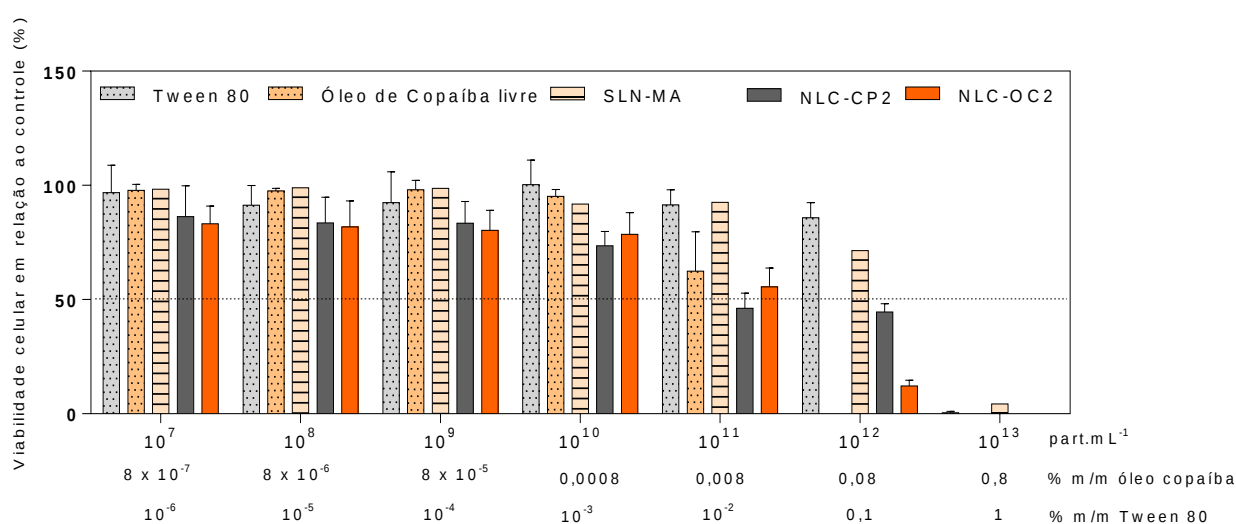
**Figura 38.** Difratogramas de raios-X obtidos a utilizando-se uma fonte de Cu-K $\alpha$ , corrida de 2 °.min<sup>-1</sup>. **A**, palmitato de cetila puro (CP), Tween 80 (T80), Articaína base (ATC), Carreadores lipídicos nanoestruturados sintéticos sem anestésico (NLC-CP2) com anestésico (NLC-CP2-A) e **B**, manteiga de abacate pura (MA), óleo de copaíba puro (OC), T80, ATC, carreadores lipídicos nanoestruturados natural sem anestésico (NLC-OC2) e com anestésico (NLC-OC2-A). Em cada gráfico, as escalas entre as amostras são iguais, para comparação.

### 3.11 Citotoxicidade *in vitro*

A nanotoxicidade tem despertado uma crescente preocupação na última década, principalmente quando se visa uma aplicação clínica dos DDS nanométricos (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014). Neste sentido, ensaios de viabilidade celular proporcionam a avaliação

da ação terapêutica, dos excipientes da matriz das nanopartículas e da influência das suas propriedades físico-químicas que podem desencadear efeitos biológicos adversos nas células e tecidos (MENDES et al., 2015; MONTEIRO-RIVIERE; INMAN; ZHANG, 2009; RIBEIRO et al., 2017). Uma nanopartícula pode causar citotoxicidade por diferentes mecanismos: i) ao aderir na célula através da membrana celular, provocando alterações nesta e levando à morte celular; ii) após sua degradação, com consequente liberação de produtos citotóxicos ou iii) por citotoxicidade intracelular, quando após a internalização da nanopartícula ela for citotóxica para a célula (PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). As SLN e os NLC apresentam uma baixa citotoxicidade, mas esse efeito é dependente da composição da sua matriz lipídica (BARBOSA et al., 2013; RIDOLFI et al., 2011; SCHÖLER et al., 2000).

Como já dito, o ensaio de viabilidade celular proporciona avaliação da resposta celular frente ao sistema nanométrico e seus excipientes (MENDES et al., 2015; MONTEIRO-RIVIERE; INMAN; ZHANG, 2009; RIBEIRO et al., 2017). Assim, o primeiro ensaio visou comparar os diversos excipientes nos NLC selecionados (NLC-CO2-A e NLC-CP2-A) na viabilidade de células de Schwann. Primeiramente, testou-se a toxicidade dos NLC sem ATC (NLC-CO2 e NLC-CP2). Como controle utilizamos o surfactante Tween 80 livre em solução, óleo de copaíba puro e uma formulação de nanopartículas preparadas somente com manteiga de abacate e T80, ou seja, de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN-MA). Os resultados são apresentados na Figura 39.



**Figura 39.** Viabilidade celular após 24 horas de tratamento de células neuronais de Schwann (ATCC® CRL-2765). Tween 80, formulação de Tween 80 em água; SLN-MA, nanopartícula lipídica sólida de manteiga de abacate; NLC-CP2 carreador lipídico nanoestruturado composto por lipídios sintéticos e NLC-CO2 carreador lipídico nanoestruturado composto por manteiga de abacate e óleo de copaíba.

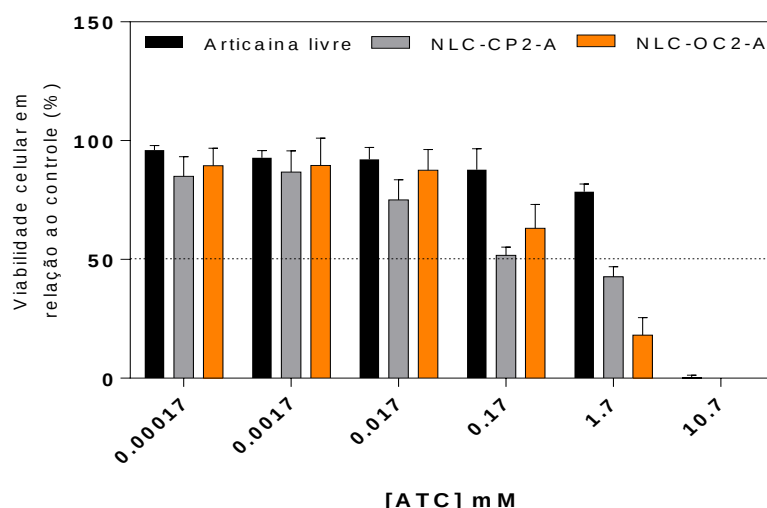
Como podemos observar as formulações NLC-CO2 e NLC-CP2 causaram diminuição da viabilidade celular dependente da concentração de nanopartículas, desde a concentração mais baixa testada (10<sup>7</sup> nanopartículas.mL<sup>-1</sup>). Este resultado corrobora a literatura que relata que a

quantidade de nanopartículas é determinante na resposta de toxicidade celular (MENDES et al., 2015). O surfactante Tween 80 não parece ser o principal causador da nanotoxicidade dos NLC pois, somente na maior concentração utilizada, foi capaz de causar a diminuição da viabilidade celular das células de Schwann. Para as nanopartículas de lipídio sintético, NLC-CP2, cuja composição é palmitato de cetila + Daykol 6040 + Tween 80, a toxicidade é provavelmente dependente da composição lipídica, desde as menores concentrações testadas, atingindo o IC50 (dose necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular) em cerca de  $10^{11}$  nanopartículas.mL<sup>-1</sup>. Resultado semelhante foi relatado na literatura para outros NLC, sendo a citotoxicidade dependente da composição lipídica (BARBOSA et al., 2013; RIDOLFI et al., 2011; SCHÖLER et al., 2000).

A nanopartícula composta por lipídios naturais (NLC-CO2, manteiga de abacate + óleo de copaíba + Tween 80) também apresentou citotoxicidade dependente da concentração de nanopartículas. Porém, neste caso, observou-se que o óleo de copaíba livre apresentou maior toxicidade nas células testadas. Já em 0,008% m/m de OC observou-se cerca de 50% de células inviáveis. O óleo de copaíba deve ser responsável pela maior toxicidade desses NLC em relação aos NLC compostos por lipídios sintéticos. Não foi encontrado na literatura para o tipo celular estudado um valor de IC50 para o óleo de copaíba. Porém, Destryana e col. encontraram um IC50 de 0,0056% na linhagem celular murina de macrófagos RAW 264.7 (AMILIA DESTRYANA et al., 2014) e Veiga Junior e col. encontraram, para dois tipos de óleo de copaíba, uma morte celular de 100% na concentração de 0,005% em macrófagos peritoneais de camundongos (VEIGA et al., 2007). Assim, nosso resultado de citotoxicidade para o óleo de copaíba mostra-se compatível com a literatura.

Em relação ao cloridrato de ATC, o IC50 calculado foi de aproximadamente 5,8 mM (Figura 7, apresentada na parte 1 desta tese). Em fibroblastos de camundongos (3T3), no mesmo tempo de incubação, Melo e col. encontraram um IC50 para ATC em torno de 4 mM, mostrando que as células de Schwann são mais resistentes a ATC (MELO et al., 2014). Dada a já bem descrita toxicidade de AL, esses resultados são esperados (ARAÚJO et al., 2005).

Uma das alternativas para controlar a citotoxicidade intrínseca dos AL seria sua encapsulação em DDS, capazes de promover liberação sustentada e, conseqüentemente, reduzir sua citotoxicidade (DE PAULA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2017). Entretanto, os resultados expressos na Figura 40 em função da concentração de ATC nos NLC demonstram que as NLC apresentam toxicidade per se, não devida à ATC, mas sim a composição lipídica, como demonstrado e discutido anteriormente.



**Figura 40.** Comparação da viabilidade celular após 24 horas de tratamento na linhagem celular de células neuronais de Schwann (ATCC® CRL-2765) entre a articaína livre e as duas formulações de NLC otimizadas.

Assim, nas formulações selecionadas, a associação dos vários componentes promoveu uma toxicidade intrínseca ao sistema. Desta forma, compreender as interações biofísico-químicas que ocorrem entre fármaco-carreador e célula alvo é de grande relevância no que diz respeito a segurança e aplicação pré-clínica de sistemas nanotecnológicos, no desenvolvimento e gestão de fármacos (MENDES et al., 2015). Existe na literatura recente uma discussão de que sistemas carreadores devem ser avaliados como um todo, pois a associação de vários excipientes no nanocarreador pode conferir propriedades diferentes daquelas apresentadas pela soma de seus componentes. Esse novo sistema nanométrico seria, então, melhor representado pelo número de partículas em suspensão, que guarda correlação direta com a atividade biológica (MENDES et al., 2015; RADAIC et al., 2016). Assim, os resultados aqui apresentados demonstram que a citotoxicidade das formulações desenvolvidas decorre da constituição lipídica das mesmas, principalmente pela adição do óleo essencial.

### 3.12 Testes *in vivo* em modelos murino

#### 3.12.1 Modelo de dor inflamatória induzida por carragenina

A  $\lambda$ -carragenina, um polissacarídeo sulfatado linear extraído de algas comestíveis vermelhas, induz uma inflamação aguda altamente reprodutível quando injetada na pata de ratos. Assim, ela é comumente usada para induzir inflamação, elicitando todos os seus sinais cardinais (edema, hiperalgesia, eritema e calor) imediatamente após a injeção subcutânea (NAPIMOGA et al., 2007). Além disso, a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a estímulos térmicos e mecânicos) provocada pela carragenina, a torna apropriada para o estudo da dor inflamatória (NANTEL et al., 1999). Duas fases do processo inflamatório são induzidas pela  $\lambda$ -carragenina: a primeira – que

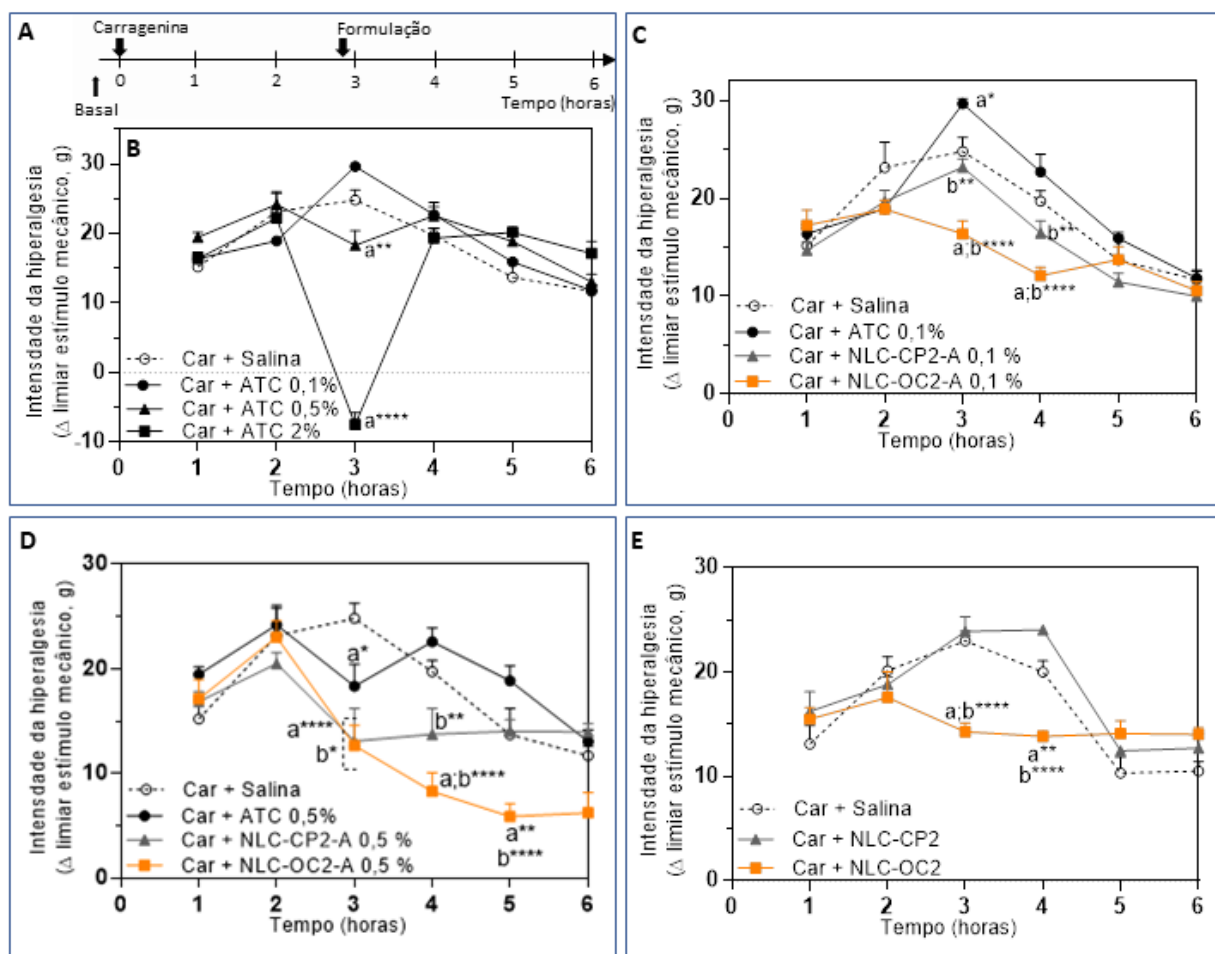
ocorre dentro da primeira hora de injeção – é associada com a liberação de histamina, serotonina e bradicinina enquanto a segunda fase – que ocorre de 1-3 ou mais horas – é caracterizada pela liberação de prostaglandinas. (PATIL; PATIL, 2017).

Neste estudo medimos a intensidade da hiperalgesia mecânica ao longo de todo o processo inflamatório (de 1 a 6 h, Figura 41A) e percebemos que o pico da dor ocorreu após 3 h da injeção de  $\lambda$ -carragenina (controle; Car + salina), quando todos os mediadores inflamatórios estavam presentes (Figura 41B). Por esse motivo, as formulações foram injetadas 10 min antes do pico de dor (Figura 41A). Assim, a Figura 41B mostra o teste de dose-resposta para a solução de ATC livre, testada em diferentes concentrações (0,1, 0,5 e 2%). Na concentração de ATC de 0,1%, houve um aumento de 19% na intensidade de hiperalgesia em relação ao grupo controle. Muito provavelmente o pH ácido desta solução ( $5,2 \pm 0,1$ ) junto com a sensibilidade ao local de aplicação podem ter gerado esta resposta. A concentração de ATC de 0,5% permitiu visualizar uma diferença significativamente menor (27%) na intensidade de hiperalgesia em relação ao grupo controle. Por fim, a concentração de 2% induziu uma anestesia profunda na pata do animal. Por isso, esta concentração foi excluída dos testes seguintes por não permitir medir se a formulação de NLC-ATC traria efeitos potencializadores. Além do mais, esses resultados comprovam o efeito dose-dependente da ATC no controle da dor inflamatória.

A Figura 41C mostra os resultados obtidos com formulações de ATC encapsulada em NLC, a 0,1%. A amostra NLC-CP2-A, composta por lipídios sintéticos, apresentou uma melhora da anestesia de 6,5% em relação ao controle (Car + salina) e de 22% ( $p < 0,05$ ) em relação a ATC livre (desde que a ATC livre aumentou a hiperalgesia do animal). A amostra de ATC encapsulada nos NLC com lipídios naturais (NLC-OC2-A) apresentou, em relação ao controle, uma diminuição na intensidade de hiperalgesia de 34%, ou seja, bem mais evidente do que a observada com NLC-CP2-A. Além disso, NLC-OC2-A manteve seu efeito anestésico após 1 hora de aplicação.

As formulações de NLC com 0,5% de ATC (Figura 41D) logo após sua aplicação mostraram resultados semelhantes, em termos de analgesia: ambas diminuíram a sensibilidade dolorosa em cerca de 50%, em relação ao controle (Car + salina) e em cerca de 30% em relação à ATC livre. No grupo tratado com a formulação de NLC com lipídios sintéticos (NLC-CP2-A), houve um prolongamento da atividade anestésica por uma hora, ou seja, até a quarta hora de análise. Contudo, na quinta hora de análise tinha seus valores retornados aos valores do grupo controle. Um perfil diferente foi observado com a formulação de NLC natural (NLC-OC2-A): os animais que receberam este tratamento tiveram uma melhora crescente (diminuição da sensibilidade dolorosa) até o fim do experimento (em 4, 5 e 6 h).

Por fim, a Figura 41E mostra as formulações de NLC controle, sem ATC. Nota-se que a amostra de NLC compostos por lipídios sintéticos (NLC-CP2) se comportou de forma similar ao grupo controle (Car + salina). Porém os NLC compostos por MA e óleo de copaíba (NLC-OC2) desencadearam uma analgesia cerca de 40% maior em relação ao grupo controle, logo após sua injeção. Além disso, a analgesia se manteve até a próxima hora de análise (quarta hora de experimento).



**Figura 41:** Medidas de hiperalgesia inflamatória induzida por  $\lambda$ -carragenina (Car) *in vivo*. **A**, linha do tempo do desenho experimental; **B**, limiar nociceptivo mecânico medido pelo teste eletrônico de von Frey, após tratamento com solução salina (controle) e solução de articaína livre a 0,1, 0,5 e 2%. **C**, limiar nociceptivo de articaína em solução (ATC) ou encapsulada nos NLC a 0,1% ou **D**, 0,5%. **E**, limiar nociceptivo dos NLC controle, sem articaína, preparados com lipídios sintéticos (NLC-CP2) ou naturais (NLC-OC2). Análise estatística: ANOVA unidirecional mais Tukey – Kramer *post hoc*. a, em relação ao controle salina; b, em comparação com ATC livre. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ . Os dados foram expressos pelo  $\Delta$  (delta) do limiar mecânico (g), calculado subtraindo-se a média das três medidas após o tratamento, da média das medidas antes do tratamento (basal).

Dentre as vantagens de encapsular AL em NLC temos a liberação sustentada (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019) e a proteção do fármaco encapsulado contra a degradação sistêmica (SEVERINO et al., 2012). Essas características dos NLC-ATC seriam de interesse em casos de hiperalgesia inflamatória, que requerem doses maiores de AL no local da

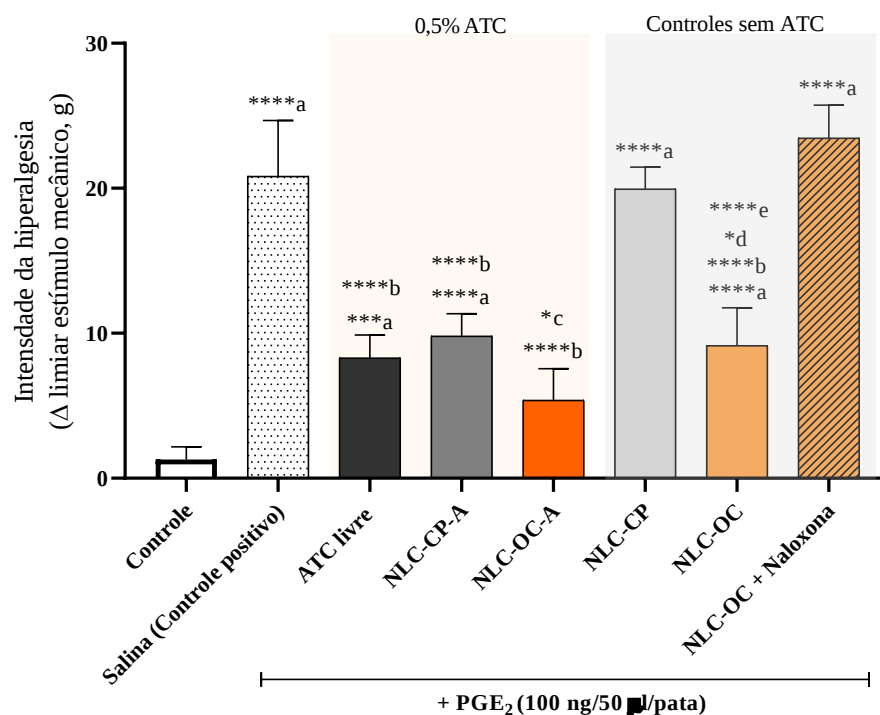
injeção. Outro atributo dos sistemas nanoparticulados é sua internalização pelas células (FERREIRA et al., 2014). Em tecidos inflamados, onde o menor pH do tecido aumenta a protonação e reduz a partição do AL nas membranas, a internalização da nanopartícula pelas células poderia oferecer outra via para o anestésico se ligar ao portão de inativação do canal de sódio voltagem-dependente, localizado no lado citoplasmático da membrana (SCHOLZ, 2002). Em conjunto, esses atributos do sistema nanoparticulado baseado em lipídios podem explicar a capacidade dos NLC-ATC de aumentar a anestesia em tecidos inflamados, como encontrado nos testes realizados, nas duas concentrações de ATC testadas.

Além disso, embora especulativas, as Figuras 41C e 41D mostram que a ATC livre (ATC) - a 0,1 e 0,5% - produziu um aumento na dor após sua injeção que poderia ser explicado pelo baixo pH da solução de cloridrato (4,8-5,2). O baixo pH, juntamente com o processo inflamatório, explicaria a hiperalgesia. Efeito de hiperalgesia semelhante foi observado com os NLC de lipídios sintéticos controle (NLC-CP2, pH ~ 4-5), 4 horas após a injeção de carragenina. De forma diferente, o pH das formulações de NLC com ATC, sintética e natural (8-8,5) é próximo ao pKa da ATC (7,8) (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019) de forma que a maior parte das moléculas do AL se encontra na forma neutra, de maior partição nas membranas, explicando o efeito de anestesia mais eficaz.

### 3.13.2 Modelo de dor inflamatória induzida por prostaglandina E2

A prostaglandina E2 (PGE2) é a principal prostaglandina pró-inflamatória, sendo responsável por uma das principais características da inflamação, a hipersensibilidade dolorosa (LIN et al., 2006). Assim, o modelo de PGE2, em relação ao de dor inflamatória induzida por carragenina, não desencadeia toda a cascata inflamatória, mas somente ativa os receptores de dor. Os resultados deste teste encontram-se na Figura 42 onde utilizamos a concentração de 0,5% de ATC para todas as formulações. Neste modelo em que não há acidose tecidual (não há diminuição da atividade dos AL), não houve diferença estatística significativa (teste T,  $p > 0,05$ ) entre o efeito da ATC livre e encapsulada em NLC no controle de dor, mas ambas as formulações diminuíram em ~50% a dor, em relação ao controle (sol. Salina). Contudo, a formulação que contém óleo de copaíba (NLC-OC-A) se mostrou significativamente melhor (~20%), em relação a diminuição da sensibilidade à dor, da NLC composta apenas com lipídios sintéticos (NLC-CP-A). Como já é descrito, o óleo de copaíba apresenta atividade em receptores opioides (GOMES et al., 2007). Assim, nos grupos controles (sem ATC: NLC-CP e NLC-OC), notamos a capacidade de diminuição da dor induzida por PGE2 na formulação contendo somente o óleo de copaíba (NLC-OC). A fim de comprovar a atuação em receptores opioides, foi injetada naloxona (antagonista

receptor opioide) junto com a formulação de NLC-OC, o que suprimiu o efeito anteriormente observado de diminuição de dor das NLC-OC. Assim, a atividade opioide do óleo de copaíba foi conservada pelas NLC, podendo contribuir para o controle da dor inflamatória quando administrada com ATC, como proposto nesta tese.



**Figura 42.** Modelo de dor inflamatória induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Análise estatística, Teste T: a= em relação ao controle; b= em relação ao grupo Salina; c= em relação ao grupo NLC-CP-A; d= em relação ao grupo NLC-CP-A; e= em relação ao grupo + Naloxona. \*p<0,05; \*\*\*p<0,005, \*\*\*\*p<0,001.

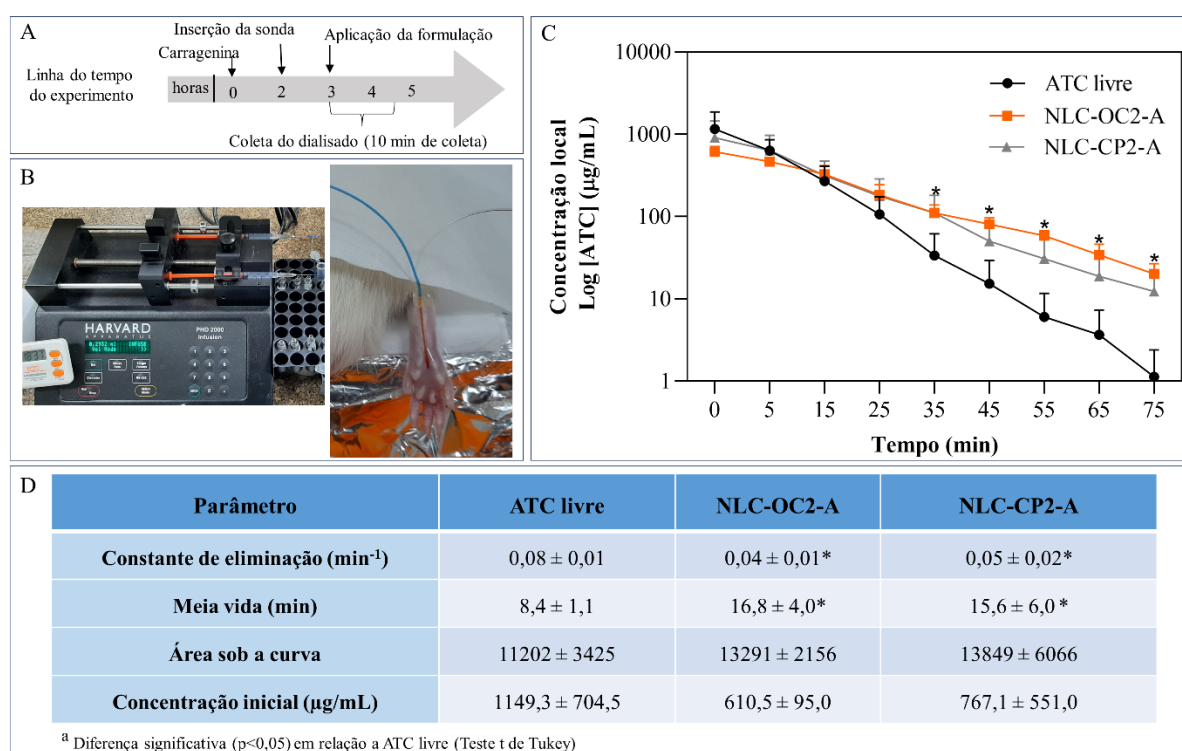
### 3.14 Estudo farmacocinético (microdiálise local em tecido inflamado)

No modelo de dor induzida por carragenina, os dados obtidos mostraram um aumento na potência anestésica no momento da aplicação, assim como um prolongamento do efeito em 1 hora, para a ATC encapsulada nos NLC de lipídio sintética e de mais de 2 horas para a ATC encapsulada nos NLC com óleo de copaíba. Assim, decidimos realizar o teste de farmacocinética local em tecido inflamado, utilizando a técnica de microdiálise tecidual para quantificar a ATC e melhor compreender os dados obtidos no estudo do efeito fisiológico (farmacodinâmica).

O procedimento experimental foi similar ao utilizado no estudo da dor induzida por carragenina, para fins de comparação, ou seja, após a injeção de carragenina, esperou-se o desencadeamento de todo processo inflamatório e as formulações foram aplicadas no pico da dor inflamatória, em 3 horas (Figura 43A). A inserção da sonda de microdiálise foi feita na segunda hora após a aplicação de carragenina, tempo necessário para a estabilização da sonda no tecido.

Uma foto da bomba infusora utilizada, assim como da sonda inserida na pata inflamada do animal são mostradas na Figura 43B.

Os resultados de concentração local de ATC em função do tempo nas amostras testadas são dadas na Figura 44C. Vemos que a partir do tempo de 35 minutos a concentração de ATC no grupo tratado com ATC livre é menor, em relação aos grupos tratados com ATC encapsulada. Também notamos que a concentração no tecido, no grupo tratado com ATC livre, sofre um decaimento mais pronunciado em relação aos grupos tratados com NLC-ATC. Assim, já nestes resultados, percebemos que a encapsulação promove uma liberação sustentada, com decaimento da concentração de ATC no tecido inflamado.



**Figura 44.** Estudo farmacocinético. **A**, linha do tempo experimental; **B**, fotos do aparelho infusor e da sonda de microdialise inserida na pata inflamada do animal; **C**, Concentração local de articaína (ATC) em escala logarítmica em função do tempo no tecido inflamado e **D**, Tabela com os parâmetros farmacocinéticos calculados. \* Diferença estatística significativa em relação ao grupo ATC livre (T test; p<0,05).

Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir dos resultados de concentração (Figura 44D) mostram melhor a influência da encapsulação da ATC nos NLC. Vemos que a constante de eliminação ( $k_e$ ) da ATC no tecido é de  $0,08 \text{ min}^{-1}$  quando não encapsulada, enquanto a ATC encapsulada mostrou  $k_e$  de  $0,04 \text{ min}^{-1}$  em NLC-OC2-A e de  $0,05 \text{ min}^{-1}$  na NLC-CP2-A, ambos resultados significativamente diferentes ( $p<0,05$ ) daquele da ATC livre. Assim, a ATC livre é retirada sistemicamente do tecido inflamado de forma mais rápida que a encapsulada. Desta forma, a encapsulação, corroborando os resultados do estudo *in vitro*, promoveu uma liberação prolongada da ATC no tecido inflamado, mantendo por maior tempo concentrações mais altas de

ATC no tecido. A partir dos 35 minutos de experimento este efeito torna-se evidente e, provavelmente devido a isto, conseguimos observar um efeito no controle da dor nos grupos tratados com NLC-ATC e não no grupo ATC livre. Como a fração encapsulada da ATC nas NLC foi alta (~70%), a liberação prolongada permitiu manter concentrações teciduais efetivas para o controle da dor por um maior tempo.

Confirmando este dado, a meia vida da ATC no tecido inflamado foi de 8,4 min quando injetada na forma livre e o dobro (16-17 min), quando administrada em NLC. Assim, embora a degradação da ATC esteja ocorrendo fisiologicamente da mesma maneira no tecido inflamado, a liberação prolongada sustenta por um tempo maior no tecido a concentração de ATC necessária para a produção do efeito, aumentando o tempo de meia vida. Cabe ressaltar que não há estudo na literatura que mostre a farmacocinética da ATC em um tecido específico, mas somente em plasma (20-27 min). Assim, em tecido periférico patológico (com inflamação), a meia vida da ATC livre se mostrou muito menor. Contudo, quando encapsulada, os valores encontrados (15-17 min) são mais similares aos dados de meia vida plasmática.

Assim, os dados de meia vida e  $k_e$  corroboram os resultados de farmacodinâmica que mostraram que a ATC livre promoveu anestesia inferior a 1 hora, enquanto as formulações de NLC-ATC, prolongaram o efeito anestésico por mais de 1 hora, justamente pela manutenção da concentração de anestésico no tecido inflamado. Além disso, a capacidade de prolongar o efeito anestésico foi relatada anteriormente para AL encapsulado em NLC em tecidos saudáveis (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019), mas nunca em um modelo de dor inflamatória periférica. Assim, a liberação prolongada de ATC dos NLC explica esse efeito notável.

Uma das explicações para a causa da falha anestésica é que, devido a inflamação, o AL pode sofrer absorção sistêmica mais rapidamente, dada a vasodilatação promovida pelo processo inflamatório (VIRDEE; SEYMOUR; BHAKTA, 2015). Assim, nossos resultados demonstram que a encapsulação em NLC pode neutralizar este efeito próprio da condição inflamatória tecidual, mantendo níveis mais elevados de AL no sítio de ação, para manter a anestesia. Assim, os NLC parecem ser sistemas promissores para evitar o efeito fisiológico adverso de absorção mais rápida dos AL, assim como abre a possibilidade para testes com outros fármacos em tecidos inflamados.

Os outros parâmetros analisados, área sob a curva (ASC) e concentração inicial (C<sub>0</sub>), apesar de não terem revelado diferença significativa entre os grupos devido ao grande desvio padrão nos dados, forneceram algumas indicações importantes. A ASC maior nos grupos tratados com NLC-ATC (~13000) em relação a ATC livre (11000) mostra maior concentração de ATC e por maior tempo nos grupos tratados com ATC encapsulada, como indicado pelos outros parâmetros analisados. Além disso, a C<sub>0</sub> foi maior (em torno de 50%; 1149  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) no grupo ATC livre em relação aos grupos NLC-OC2-A (610  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e NLC-CP2-A (767,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Este resultado era esperado, já que a fração de ATC livre nas amostras de NLC-ATC é de ~30%. Assim, confirmamos que a fração da ATC que não aparece na C0 é liberada aos poucos no tecido, alterando sua taxa de eliminação e meia vida no tecido inflamado.

Os dados de farmacocinética confirmam os de farmacodinâmica que mostram um maior tempo de duração anestésica da ATC pela sua encapsulação nas NLC que promove uma liberação prolongada, mantendo níveis efetivos por mais tempo no tecido inflamado. Contudo, o maior tempo de anestesia ou de diminuição da dor foi encontrado no grupo contendo NLC funcionalizadas com óleo de copaíba. Como mostrado, a atividade nos receptores opioides do OC provavelmente é a responsável pelo melhor controle da dor inflamatória em relação a nanopartícula preparada com lipídios sintéticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi alcançado pelo uso do óleo de copaíba, com ação adjunta à ATC.

Mesmo nos tempos iniciais do teste o efeito anestésico nos grupos tratados com NLC-ATC, foi maior que o da ATC livre mesmo tendo maior concentração no tecido. Assim, provavelmente outros fatores estão envolvidos na maior eficácia anestésica destas nanoformulações no tecido inflamado. Uma das causas da falha anestésica é a diminuição do pH local no tecido inflamado, com consequente diminuição da fração da forma neutra do AL, de maior partição em membrana, onde se insere no canal de sódio voltagem dependente (BECKER; REED, 2012; MEECHAN, 1999; UENO et al., 2008a). Nesse sentido a regra de Meyer-Overton define que a potência anestésica aumenta com a solubilidade lipídica, assim, a forma neutra, com maior lipofilicidade, tem maior potência anestésica (CROSS; PLUNKETT, 2014). Exemplificando, a ATC em solução é administrada em forma de cloridrato, cujo pH é menor que 6. Assim, no tecido inflamado que já possui um pH menor que o fisiológico (7,4), a infiltração de uma solução ácida, favorecem a forma protonada do AL, de menor efeito anestésico. Exemplificando, sendo o pKa da ATC 7,8, em um tecido inflamado, cujo pH pode diminuir no mínimo 0,5 unidade, teríamos uma fração de ATC neutra menor que 10%, justificando o menor efeito anestésico.

Para resolver este problema da ionização dos AL, autores já desenvolveram e testaram formulações com pH tamponado a fim de garantir a administração de AL na forma neutra. Kattan e colaboradores publicaram uma revisão sistemática mostrando que AL administrados em solução tamponada com pH neutro promoveram uma anestesia pulpar 2,3 vezes maior em relação a anestésicos administrados em solução ácida (KATTAN et al., 2019). Assim, a administração de soluções com maior fração de AL na forma neutra promove maior anestesia. Em relação aos resultados desta tese, uma vantagem dos NLC é que a incorporação da forma neutra do AL em seu preparo, aumenta a taxa de encapsulação nestas partículas lipofílicas, (DE ARAÚJO; RIBEIRO; DE PAULA, 2019). Assim, nas formulações de NLC-ATC provavelmente um dos

fatores relacionados ao aumento da atividade anestésica inicial é a presença da forma neutra do anestésico diretamente no tecido inflamado já que o pH destas formulações é entre 7,5-8,0.

Na literatura, existem poucos artigos relatando a encapsulação da ATC: em ciclodextrina (BURGA-SÁNCHEZ et al., 2020), em nanocápsulas poliméricas, (DA SILVA et al., 2021) e em lipossomas (DA SILVA et al., 2016). Em nanocápsulas poliméricas e em lipossomas os autores apresentaram resultados *in vivo* no controle da dor em modelo de inflamação crônica e compararam com soluções de ATC livre, com vasoconstritor. Neste caso, o efeito do vasoconstritor promoveu uma anestesia similar da ATC livre em relação as nanoformulações. Esses resultados demonstram que a absorção sistêmica da ATC pode ser uma das principais causas da falha ou queda na potência anestésica. Neste sentido, a formulação NLC-ATC se mostrou eficiente para controlar o efeito vasodilatador sem a necessidade de uso de vasoconstritor. Contudo, seria interessante conduzir mais estudos para comparar os promissores resultados obtidos na formulação de NLC com outros DDS assim como com formulação contendo vasoconstritor, por exemplo em modelo de dor aguda, próprio de pacientes que necessitam de tratamento odontológico de emergência.

Uma inovação da formulação proposta neste trabalho é o uso de excipientes funcionais. Nesse caso, o óleo de copaíba mostrou eficácia no controle da dor inflamatória, com sinais de melhora na resolução do processo inflamatório, já que a dor foi diminuída após sua injeção até o final do experimento de dor aguda (Figura 41D). Contudo, sabemos que a aprovação de uso de uma formulação infiltrativa contendo óleo de copaíba necessita muitos estudos pré-clínicos, dada a diversidade de compostos presentes no óleo essencial, cuja composição pode variar entre lotes e fabricantes. O principal componente do óleo de copaíba (~50%) é o  $\beta$ -cariofileno (BCF), um sesquiterpeno natural encontrado em vários tipos de óleos essenciais (copaíba, alho, pimenta negra, cannabis sativa, ...) (HENDRIKS et al., 1975). O BCF é um agonista do receptor canabinóide tipo 2 (BAHI et al., 2014). Assim, além de sua função anti-edema (KUWAHATA et al., 2012), sua atividade no tratamento da dor inflamatória e neuropática já foi relatada (AGUILAR-ÁVILA et al., 2019; CECCARELLI et al., 2020). Por fim, acreditamos que o próximo passo para em direção aplicação clínica da formulação de NLC-OC2-A aqui descrita seria a substituição do óleo de copaíba por BCF puro, um composto já comercializado. Assim, a reprodutibilidade e produção em larga escala seriam garantidas, favorecendo sua aprovação para uma administração por via infiltrativa, em odontologia. Nos parece que esse tipo de formulação inovadora para aplicação odontológica, na anestesia em patologias inflamatórias, com maior propriedade anestésica e analgésica, teria grande futuro no mercado.

#### 4. CONCLUSÕES PARTE 2

A falha anestésica em tecido inflamado é um grande desafio a ser vencido na odontologia. Nesta tese, aplicamos a nanotecnologia associada ao uso de excipiente natural da biodiversidade brasileira (óleo de copaíba) como ferramentas para resolução deste problema, intrínseco aos AL. Com isso, desenvolvemos uma tecnologia inovadora para a resolução de um problema clínico.

Em termos de desenvolvimento DDS, trouxemos neste uma abordagem peculiar (e assertiva) para seleção e escolha dos excipientes das NLC: acoplamento da ferramenta multivariada de planejamento experimental (DoE) com o modelo de peixe-zebra. No cenário mundial de desenvolvimento farmacológico, DoE é uma ferramenta quase mandatória e preconizada pelas agências reguladoras (ICH Q8). Com DoE conseguimos selecionar formulações de NLC com melhores características físico-químicas para a aplicação desejada, assim como entender a influência de cada excipiente da formulação nestas características, determinando uma faixa ideal de concentração de excipientes que atendem as características desejadas da formulação. Além disso, no intuito de testar os melhores excipientes e uma grande quantidade de formulações, com baixo custo e em pouco tempo, utilizamos o modelo peixe-zebra, que foi essencial para a escolha das melhores formulação, com a atividade biológica requerida. Esta abordagem conjunta permitiu, por exemplo, identificar *in vivo* que dois surfactantes não iônicos muito utilizados em NLC (Tween 80 e Pluronic F-68) não alteraram os efeitos biológicos das NLC testadas em peixe-zebra, porém mostraram influências opostas nas propriedades físico-químicas das mesmas (por DoE).

Após determinadas as formulações otimizadas, o uso do óleo de copaíba como excipiente funcional potencializou o efeito anestésico da ATC em tecidos inflamados. Quando aplicados em um modelo de dor induzida por carragenina, os NLC reduziram significativamente a dor inflamatória e prolongaram o tempo de anestesia, em comparação à ATC em solução. Assim, extrapolando para o uso clínico, a formulação funcionalizada seria indicada para controle da dor intra- e pós-operatória. Além disso foi possível constatar que a atividade opioide do óleo de copaíba foi mantida na formulação de NLC, somando-se ao efeito antinociceptivo do AL. Por fim, através das medidas de farmacocinética vimos que os NLC proporcionaram, através de uma liberação prolongada, níveis efetivos de ATC por mais tempo no tecido inflado, prevenindo sua absorção sistêmica (que seria favorecida pela vasodilatação provocada pela inflamação). Esta parece ser uma propriedade interessante da encapsulação de fármacos em NLC para aplicação em tecidos inflamados. Além disso, o uso de ATC na forma neutra no preparo dos NLC e o pH alcalino destes pode ser muito interessante em casos de inflamação tecidual, cuja acidez local é uma das causas da falha anestésica.

Como conclusão entendemos que o sistema desenvolvido se trata de uma solução inovadora e promissora para o controle da dor em tecidos inflamados. Além disso, o uso de excipiente funcional, óleo de copaíba, trouxe melhora ao sistema por atuar em conjunto com a ATC no controle da dor. Assim, esta tese abre possibilidade para o desenvolvimento de uma tecnologia nova em odontologia capaz de melhorar uma condição clínica de difícil atuação que é o tratamento odontológico da dor em pacientes com patologias dentais inflamatórias.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS PARTE 2

Na proposta inicial desta tese, propusemos duas abordagens diferentes para a solução do controle da dor em tecido inflamado. A encapsulação da ATC (já comumente utilizada na clínica) em NLC assim como do anestésico do tipo éster, butamben, um AL extremamente hidrofóbico, de uso exclusivamente tópico e que em pH fisiológico ácido (tecido inflamado) está sempre na forma neutra, de maior potência anestésica. Contudo, durante o andamento e escrita da tese foi preferido relatar somente os dados referentes aos trabalhos com a ATC.

Apesar de não relatada nesta tese, durante os anos de doutoramento foi também desenvolvido, como previsto inicialmente, a encapsulação do butamben em NLC. Os dados relativos deste projeto foram publicados no artigo: “Lipid nanoparticles loaded with butamben and designed to improve anesthesia at inflamed tissues; Biomaterials Science, v. 9, p. 3378-3389, 2021” (<https://doi.org/10.1039/D1BM00077B>). Contudo, para esta formulação utilizamos somente excipientes sintéticos pois não foi possível encontrar uma formulação estável de NLC com butamben usando excipientes funcionais de lipídios naturais, como no caso da ATC.

Naquela publicação mostramos que foi possível produzir uma formulação de NLC-butamben ideal para aplicação parenteral, prolongando sua liberação *in vitro*, com diminuição da citotoxicidade, sem induzir qualquer alteração tóxica *in vivo*. No modelo de hiperalgesia inflamatória por carragenina, a formulação NLC-butamben mostrou também potencial para o manejo da dor inflamatória, apresentando maior eficácia analgésica (40%) e efeito prolongado. Assim, ambas abordagens foram promissoras para a resolução do problema proposto (controle da dor em tecido inflamado). Contudo, nos parece que a utilização de um excipiente funcional traz resultados mais promissores e interessantes para o mercado, em termos de inovação.

## **V. REFERÊNCIAS**

- ADADE, A. B.; CHIGNELL, D.; VANDERKOOI, G. Local anesthetics: A new class of partial inhibitors of mitochondrial ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 16, n. 5–6, p. 353–363, 1984.
- AGUILAR-ÁVILA, D. S. et al.  $\beta$ -Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Attenuates Neuropathic Pain and Depressive-Like Behavior in Experimental Diabetic Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 5, p. 460–468, 2019.
- AL-MAHALAWY, H. et al. Articaine Versus Lidocaine Concentration in the Palatal Tissues After Supraperiosteal Buccal Infiltration Anesthesia. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 76, n. 2, p. 315–315, 2018.
- ALVERS, A. L. et al. Single continuous lumen formation in the zebrafish gut is mediated by smoothened-dependent tissue remodeling. **Development (Cambridge, England)**, v. 141, n. 5, p. 1110–9, 2014.
- AMILIA DESTRYANA, R. et al. Antioxidant and Anti-inflammation Activities of Ocotea, Copaiba and Blue Cypress Essential Oils in Vitro and in Vivo. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 9, p. 1531–1542, 2014.
- ANVISA. Agência Nacional de vigilância sanitária, Brasil. **Resolução RE nº 899, de 29/05/2003**.
- ANVISA. Agência Nacional de vigilância sanitária, Brasil. **Resolução RDC Nº166, de 24/07/2017**.
- APS, J.; BADR, N. Narrative review: the evidence for neurotoxicity of dental local anesthetics. **Journal of Dental Anesthesia and Pain Medicine**, v. 20, n. 2, p. 63–72, 2020.
- ARAÚJO, A. M. et al. Toxicometabolomics: Small Molecules to Answer Big Toxicological Questions. **Metabolites 2021, Vol. 11, Page 692**, v. 11, n. 10, p. 692, 2021.
- ARAÚJO, D. R. DE et al. Drug-Delivery Systems for Racemic Bupivacaine (S50-R50) and Bupivacaine Enantiomeric Mixture (S75-R25): Cyclodextrins Complexation Effects on Sciatic Nerve Blockade in Mice. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 3, p. 316–328, 2005.
- ARTATI, A.; TOKARZ, J. Metabolomics applied to cultured human and animal cells. In: **Metabolomics for Biomedical Research**. Elsevier, 2020. p. 137–157.
- BABAZADEH, A.; GHANBARZADEH, B.; HAMISHEHKAR, H. Formulation of food grade nanostructured lipid carrier (NLC) for potential applications in medicinal-functional foods. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 50–58, 2017.
- BAHI, A. et al.  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, v. 135, p. 119–124, 2014.

- BALTAN, S. Can lactate serve as an energy substrate for axons in good times and in bad, in sickness and in health? **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 1, p. 25–30, 2014.
- BARBOSA, R. M. et al. Validation of an HPLC method for the determination of dibucaine encapsulated in solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 9, p. 1362–1369, 2013.
- BARTLETT, G.; MANSOOR, J. Articaine buccal infiltration vs lidocaine inferior dental block – a review of the literature. **Bdj**, v. 220, n. 3, p. 117–120, 2016.
- BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragment extracts. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 2–3, p. 138–142, 2003.
- BEAUCHAMP, G. K. et al. Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. **Nature**, v. 437, n. 7055, p. 45–46, 2005.
- BECKER, D. E.; REED, K. L. Local Anesthetics: Review of Pharmacological Considerations. **Anesthesia Progress**, v. 59, n. 2, p. 90–102, 2012.
- BERBEN, L.; SEREIKA, S. M.; ENGBERG, S. Effect size estimation: Methods and examples. **International Journal of Nursing Studies**, v. 49, n. 8, p. 1039–1047, 2012.
- BERDE, C. B.; STRICHARTZ, G. R. Local Anesthetics. In: **Miller's Anesthesia**. Eighth ed. Elsevier Ltd, 2016. p. 1028–1054.
- BHUPINDER, K.; AMJ, N. Impact of Pluronic F-68 vs Tween 80 on fabrication and evaluation of acyclovir SLNs for skin delivery. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2016.
- BOONE, C. H. T. et al. Oxidative stress, metabolomics profiling, and mechanism of local anesthetic induced cell death in yeast. **Redox Biology**, v. 12, n. January, p. 139–149, 2017.
- BOULANGER, Y. et al. Multiple binding sites for local anesthetics in membranes: characterization of the sites and their equilibria by deuterium NMR of specifically deuterated procaine and tetracaine. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 58, n. 10, p. 986–995, 1980.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BROWN, A. M. et al. Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axon function. **Annals of Neurology**, v. 72, n. 3, p. 406–418, set. 2012.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12<sup>a</sup> ed. McGraw Hill Brasil, 2012.
- BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405–411, 2011.

- BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 379–402, 2007.
- BURGA-SÁNCHEZ, J. et al. Physicochemical characterization and cytotoxicity of articaine-2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1–11, 2020.
- BUSCHMANN, K. et al. The olive oil-based lipid clinoleic blocks leukocyte recruitment and improves survival during systemic inflammation: A comparative in vivo study of different parenteral lipid emulsions. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- CAMPBELL, A. M.; CHAN, S. H. P. Mitochondrial membrane cholesterol, the voltage dependent anion channel (VDAC), and the Warburg effect. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 40, n. 3, p. 193–197, 2008.
- CARBONE, C. et al. Preparation and optimization of PIT solid lipid nanoparticles via statistical factorial design. **European journal of medicinal chemistry**, v. 49, p. 110–7, 2012.
- CÁRDENO, A.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C. An up-date of olive oil phenols in inflammation and cancer: molecular mechanisms and clinical implications. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 37, p. 4758–76, 2013.
- CARROLA, J. et al. Metabolomics of silver nanoparticles toxicity in HaCaT cells: structure–activity relationships and role of ionic silver and oxidative stress. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 8, p. 1105–1117, 2016.
- CASSUTO, J.; SINCLAIR, R.; BONDEROVIC, M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 50, n. 3, p. 265–282, 2006.
- CECCARELLI, I. et al. The CB2 Agonist  $\beta$ -Caryophyllene in Male and Female Rats Exposed to a Model of Persistent Inflammatory Pain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 850, 18 ago. 2020.
- CELA, O. et al. Bupivacaine uncouples the mitochondrial oxidative phosphorylation, inhibits respiratory chain complexes I and III and enhances ROS production: Results of a study on cell cultures. **Mitochondrion**, v. 10, n. 5, p. 487–496, 2010.
- CHANG, Y.-C. et al. Local Anesthetics Induce Apoptosis in Human Thyroid Cancer Cells through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89563, 2014.
- CHAZOTTE, B.; VANDERKOOI, G. Multiple sites of inhibition of mitochondrial electron transport by local anesthetics. **BBA - Bioenergetics**, v. 636, n. 2, p. 153–161, 1981.
- CHEN, H. et al. Development of a ropivacaine-loaded nanostructured lipid carrier formulation for transdermal delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 465, p. 130–136, 2015.

- CHEN, Y. et al. Nanosilver incurs an adaptive shunt of energy metabolism mode to glycolysis in tumor and nontumor cells. **ACS Nano**, v. 8, n. 6, p. 5813–5825, 2 jun. 2014.
- CHEN, Y.; BRANDIZZI, F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 11, p. 547–555, 2013.
- CLARKE, H. J. et al. Endoplasmic Reticulum Stress in Malignancy. **Cancer Cell**, v. 25, n. 5, p. 563–573, 2014.
- CLOUET, P. M.; BOURRE, J.-M. Ketone Body Utilization for Lipid Synthesis in the Murine Sciatic Nerve: Alterations in the Dysmyelinating Trembler Mutant. **Journal of Neurochemistry**, v. 50, n. 5, p. 1494–1497, 1988.
- COHEN, H. P.; CHA, B. Y.; SPÅNGBERG, L. S. W. Endodontic anesthesia in mandibular molars: A clinical study. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 7, p. 370–373, 1993.
- COLLYMORE, C. et al. Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 198–203, 2014.
- COMBRINK, M.; LOOTS, D. T.; DU PREEZ, I. Metabolomics describes previously unknown toxicity mechanisms of isoniazid and rifampicin. **Toxicology Letters**, v. 322, p. 104–110, 2020.
- CONNOLLY, M. et al. Tissue distribution of zinc and subtle oxidative stress effects after dietary administration of ZnO nanoparticles to rainbow trout. **Science of the Total Environment**, v. 551–552, p. 334–343, 2016.
- CROSS, M. E.; PLUNKETT, E. V. E. The Meyer–Overton hypothesis. **Physics, Pharmacology and Physiology for Anaesthetists**, p. 146–147, 2014.
- DA SILVA, C. B. et al. Anaesthetic efficacy of unilamellar and multilamellar liposomal formulations of articaine in inflamed and uninflamed tissue. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 54, n. 3, p. 295–300, 2016.
- DA SILVA, C. B. et al. Promising potential of articaine-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules for intraoral topical anesthesia. **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0246760, 2021.
- DA SILVA, G. H. R. et al. Bupivacaine (S75:R25) Loaded in Nanostructured Lipid Carriers: Factorial Design, HPLC Quantification Method and Physicochemical Stability Study. **Current Drug Delivery**, v. 15, n. 3, p. 388–396, 2017.
- DABADIE, P. et al. Uncoupling effects of local anesthetics on rat liver mitochondria. **FEBS Letters**, v. 226, n. 1, p. 77–82, 1987.
- DABBENI-SALA, F.; PALATINI, P. Mechanism of local anesthetic effect. Involvement of F<sub>0</sub> in the inhibition of mitochondrial ATP synthase by phenothiazines. **BBA - Bioenergetics**, v. 1015, n. 2, p. 248–252, 1990.

- DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Precise engineering of dapivirine-loaded nanoparticles for the development of anti-HIV vaginal microbicides. **Acta Biomaterialia**, v. 18, p. 77–87, 2015.
- DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 139–151, 2012.
- DE ARAUJO, D. R.; DE PAULA, E.; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: Interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1775–1783, 2008.
- DE ARAÚJO, D. R.; RIBEIRO, L.N.M.; DE PAULA, E. Lipid-based carriers for the delivery of local anesthetics. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 7, p. 701–714, 2019.
- DE LUCA, E. et al. ZebraBeat: a flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4898, 2014.
- DE MOURA, L. D. et al. Docetaxel and Lidocaine Co-Loaded (NLC-in-Hydrogel) Hybrid System Designed for the Treatment of Melanoma. **Pharmaceutics** 2021, Vol. 13, Page 1552, v. 13, n. 10, p. 1552, 2021.
- DE PAULA, E. et al. Drug delivery systems for local anesthetics. **Recent patents on drug delivery & formulation**, v. 4, n. 1, p. 23–34, 2010.
- DE PAULA, E.; SCHREIER, S. Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1240, p. 25–33, 1995.
- DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 1, p. 51–78, 2007.
- DIVAKARUNI, A. S. et al. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press Inc., 2014. v. 547p. 309–354.
- DOKTOROVOVÁ, S. et al. Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 235–252, 2016.
- DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of in vitro data. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, n. 1, p. 1–18, 2014.
- DUARTE, I. F. et al. NMR metabonomics for mammalian cell metabolism studies. **Bioanalysis**, v. 1, n. 9, p. 1597–1614, 2009.
- EID, S. A. et al. Nox, Nox, Are You There? The Role of NADPH Oxidases in the Peripheral Nervous System. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 1162, 2022

- ELKS, P. M.; LOYNES, C. A.; RENSHAW, S. A. Measuring inflammatory cell migration in the zebrafish. **Methods in Molecular Biology**, v. 769, p. 261–275, 2011.
- ERECISKA, M. et al. Cerebral Alanine Transport and Alanine Aminotransferase Reaction: Alanine as a Source of Neuronal Glutamate. **Journal of Neurochemistry**, v. 62, n. 5, p. 1953–1964, 2008.
- FAITOVA, J. et al. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. **Cellular & Molecular Biology Letters** **2006 11:4**, v. 11, n. 4, p. 488–505, 2006.
- FANG, J. Y. et al. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 633–640, 2008.
- FERREIRA, L. A. B. et al. Endocitose e tráfico intracelular de nanomateriais. Endocytosis and intracellular trafficking of nanomaterials. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 149–166, 2014.
- FERREIRA, L. E. N. et al. Comparison of liposomal and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-lidocaine on cell viability and inflammatory response in human keratinocytes and gingival fibroblasts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 791–802, 2016.
- FISHER, D. M.; HOLLMANN, M. W.; DURIEUX, M. E. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? **Anesthesiology**, v. 93, n. 3, p. 858–875, 2000.
- FLEDERICH, R. et al. Targeting myelin lipid metabolism as a potential therapeutic strategy in a model of CMT1A neuropathy. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- FORN-CUNÍ, G. et al. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- FRACETO, L. F. et al. Differential effects of uncharged aminoamide local anesthetics on phospholipid bilayers, as monitored by  $^1\text{H}$ -NMR measurements. **Biophysical Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 11–18, 2005.
- FRAZIER, D. T.; NARAHASHI, T.; YAMADA, M. THE SITE OF ACTION AND ACTIVE FORM OF LOCAL ANESTHETICS. II. EXPERIMENTS WITH QUATERNARY COMPOUNDS. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 171, n. 1, 1970.
- FREITAS, C.; MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN®) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 168, n. 2, p. 221–229, 1998.
- GABAY, O. et al. Stress-induced signaling pathways in hyalin chondrocytes: inhibition by Avocado–Soybean Unsaponifiables (ASU). **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 3, p. 373–384, 2008.

- GALDAMES, J. A. et al. Gcsf-Chr19 Promotes Neutrophil Migration to Damaged Tissue through Blood Vessels in Zebrafish. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 1, p. 372–378, 1 jul. 2014.
- GARLID, K. D.; NAKASHIMA, R. A. Studies on the mechanism of uncoupling by amine local anesthetics. Evidence for mitochondrial proton transport mediated by lipophilic ion pairs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 13, p. 7974–7980, 1983.
- GARLSTO, G. A. et al. Occurrence of paresthesia after dental local anesthetic administration in the United States. **The Journal of the American Dental Association**, v. 141, n. 7, p. 836–844, 2010.
- GAZI, M. C.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. **Antidepressivos**. In: Sakata RK, Issy AM, (editores). **Fármacos para tratamento da dor**. 1º Ed. ed. Barueri, SP: Manole, 2008.
- GERNER, P.; WANG, G. K. **Methods for selectively enhancing antinociceptive potency of local anesthetics**. Patente: US-2010190860-A1, 2010.
- GERONIMO, G. et al. Development of S75:R25 bupivacaine-loaded lipid nanoparticles functionalized with essential oils for treating melanoma. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. 8, p. 2197–2207, 2021.
- GIANNACCINI, M. et al. Non-mammalian vertebrate embryos as models in nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 4, p. 703–719, 2014.
- GOLAN, D. E. et al. Principles of Pharmacology. The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy. **Pediatric clinics of North America**, v. 58, p. 472, 2012.
- GOMASE, V. et al. Metabolomics. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 89–98, 1 jan. 2008.
- GOMES, N. DE M. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177–183, 2010.
- GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 486–492, 2007.
- GONÇALVES, N. P. et al. Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy. **Nature Reviews Neurology** 2017 13:3, v. 13, n. 3, p. 135–147, 2017.
- GONG, X. et al. Suppression of mitochondrial respiration with local anesthetic ropivacaine targets breast cancer cells. **Journal of Thoracic Disease**, v. 10, n. 5, p. 2804, 2018.
- GONZALEZ-MIRA, E. et al. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 2, p. 412–421, 2010.
- GONZALEZ-MIRA, E. et al. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. **Nanotechnology**, v. 22, n. 4, p. 045101, 2011.

- GÖPPERT, T. M.; MÜLLER, R. H. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: Comparison of plasma protein adsorption patterns. **Journal of Drug Targeting**, v. 13, n. 3, p. 179–187, 2005.
- GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 133, p. 285–308, 1 dez. 2018.
- GRANT, G. J. et al. Wound infiltration with liposomal bupivacaine prolongs analgesia in rats. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 41, n. 2, p. 204–207, 1997.
- GRAY, A. et al. The effect of local anesthetic on pro-inflammatory macrophage modulation by mesenchymal stromal cells. **International Immunopharmacology**, v. 33, p. 48–54, 1 abr. 2016.
- GRIFFIN, J. L. Twenty years of metabonomics: so what has metabonomics done for toxicology? **Xenobiotica**, v. 50, n. 1, p. 110–114, 2020.
- GRILLO, R. et al. Polymeric alginate nanoparticles containing the local anesthetic bupivacaine. **Journal of drug targeting**, v. 18, n. 9, p. 688–699, 2010.
- GUILHERME, V. A. et al. Current Challenges and Future of Lipid Nanoparticles Formulations for Topical Drug Application to Oral Mucosa, Skin, and Eye. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 43, p. 6659–6675, 2017.
- GUIMARÃES-SANTOS, A. et al. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2012, p. 918174, 2012.
- GUO, P. et al. Zebrafish as a model for studying the developmental neurotoxicity of propofol. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 12, p. 1511–1519, 2015.
- HAN, F. et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, p. 210–216, 2008.
- HASCHKE, R. H.; BYERS, M. R.; FINK, B. R. EFFECTS OF LIDOCAINE ON RABBIT BRAIN MICROTUBULAR PROTEIN. **Journal of Neurochemistry**, v. 22, n. 5, p. 837–843, 1974.
- HENDRIKS, H. et al. Mono- and sesqui-terpene hydrocarbons of the essential oil of Cannabis sativa. **Phytochemistry**, v. 14, n. 3, p. 814–815, 1975.
- HMDB. Human Metabolome Database. <http://www.hmdb.ca>.
- HOPMAN, A. J. G.; BAART, J. A.; BRAND, H. S. Articaine and neurotoxicity-A review. **British Dental Journal**, v. 223, n. 7, p. 501–506, 2017.

- HOW, C. W.; RASEDEE, A.; ABBASALIPOURKABIR, R. Characterization and cytotoxicity of nanostructured lipid carriers formulated with olive oil, hydrogenated palm oil, and polysorbate 80. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, v. 12, n. 2, p. 72–78, 2013.
- HU, H. et al. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JAN, p. 3083, 2019.
- HU, Y. et al. Reversal effects of local anesthetics on P-glycoprotein-mediated cancer multidrug resistance. **Anti-Cancer Drugs**, v. 28, n. 3, p. 243–249, 2016.
- HUITING, L. N.; LAROCHE, F.; FENG, H. The Zebrafish as a Tool to Cancer Drug Discovery. **Austin journal of pharmacology and therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 1069, 2015.
- ICH. International Conference on Harmonization. **ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology** EUROPEAN MEDICINES AGENCY
- ICH. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development**. EUROPEAN MEDICINES AGENCY
- IMPELLIZZERI, D. et al. Effect of Apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in the inflammatory process induced by an experimental model of spinal cord injury. **Free Radical Research**, v. 45, n. 2, p. 221–236, 2011.
- JANA, M.; PAHAN, K. Astrocytes, oligodendrocytes and Schwann cells. In: **Neuroimmune Pharmacology**. Springer International Publishing, 2016. p. 117–140.
- JANG, M. H. et al. Uptake, tissue distribution, and depuration of total silver in common carp (*Cyprinus carpio*) after aqueous exposure to silver nanoparticles. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 19, p. 11568–11574, 2014.
- JEFTINIJA, S. D.; JEFTINIJA, K. V. ATP stimulates release of excitatory amino acids from cultured Schwann cells. **Neuroscience**, v. 82, n. 3, p. 927–934, 1997.
- JENNING, V.; GOHLA, S. Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN®). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 219–222, 2000.
- JESKE, A. H. Local Anesthetics. In: **Contemporary Dental Pharmacology**. Springer, Cham, 2019. p. 9–22.
- JHA, M. K.; MORRISON, B. M. Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: New insights into the role of nervous system metabolic transporters. **Experimental Neurology**, v. 309, p. 23–31, 2018.
- JOHNSON, M. E. et al. Mitochondrial Injury and Caspase Activation by the Local Anesthetic Lidocaine. **Anesthesiology**, v. 101, n. 5, p. 1184–1194, 2004.
- JOUKHADAR, C.; MÜLLER, M. Microdialysis. **Clinical Pharmacokinetics** 2005 **44:9**, v. 44, n. 9, p. 895–913, 2012.

KAKROUDI, S. H. A.; MEHTA, S.; MILLAR, B. J. Articaine hydrochloride: Is it the solution? **Dental Update**, v. 42, n. 1, p. 88–93, 2015.

KAMIYA, Y.; OHTA, K.; KANEKO, Y. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. **Biomedical Research**, v. 26, n. 6, p. 231–239, 2005.

KATTAN, S. et al. Do buffered local anesthetics provide more successful anesthesia than nonbuffered solutions in patients with pulpally involved teeth requiring dental therapy? A systematic review. **The Journal of the American Dental Association**, v. 150, n. 3, p. 165–177, 2019.

KATYAL, V. The efficacy and safety of articaine versus lignocaine in dental treatments: A meta-analysis. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 4, p. 307–317, 2010.

KECK, C. M.; SPECHT, D.; BRÜSSLER, J. Influence of lipid matrix composition on biopharmaceutical properties of lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 338, p. 149–163, 2021.

KIDD, G. J.; OHNO, N.; TRAPP, B. D. Biology of Schwann cells. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 115p. 55–79.

KIM, D. K.; JUNG, K. Y. Caffeine causes glycerophosphorylcholine accumulation through ryanodine-inhibitable increase of cellular calcium and activation of phospholipase A2 in cultured MDCK cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 30, n. 3, p. 151–158, 1998.

KIM, O. K. et al. Novel nitric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1557–1563, 2000a.

KIM, O. K. et al. An avocado constituent, persenone A, suppresses expression of inducible forms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in macrophages, and hydrogen peroxide generation in mouse skin. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 11, p. 2504–2507, 2000b.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.

KOSTIDIS, S. et al. Quantitative NMR analysis of intra- and extracellular metabolism of mammalian cells: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 980, p. 1–24, 2017.

KROG, J. et al. Lipid solubility- and concentration-dependent attenuation of in vitro natural killer cell cytotoxicity by local anesthetics. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 46, n. 7, p. 875–881, 2002.

KUWAHATA, H. et al. Local Peripheral Effects of  $\beta$ -Caryophyllene through CB<sub>2</sub> Receptors in Neuropathic Pain in Mice. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 03, n. 04, p. 397–403, 2012.

- LA MONACA, E.; FODALE, V. Effects of Anesthetics on Mitochondrial Signaling and Function. **Current Drug Safety**, v. 7, n. 2, p. 126–139, 2012.
- LADDHA, A. P.; KULKARNI, Y. A. NADPH oxidase: A membrane-bound enzyme and its inhibitors in diabetic complications. **European Journal of Pharmacology**, v. 881, p. 173206, 2020.
- LAMEGO, I. et al. Metabolic markers of MG-63 osteosarcoma cell line response to doxorubicin and methotrexate treatment: Comparison to cisplatin. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 12, p. 6033–6045, 2014.
- LAY, S. LE et al. Cholesterol, a Cell Size-dependent Signal That Regulates Glucose Metabolism and Gene Expression in Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16904–16910, 2001.
- LEANDRO, L. M. et al. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 3866–3889, 2012.
- LETAMENDIA, A. et al. Development and validation of an automated high-throughput system for zebrafish in vivo screenings. **PloS one**, v. 7, n. 5, 2012.
- LIN, C. Y. et al. Characterization of the metabolic actions of crude versus dispersed oil in salmon smolts via NMR-based metabolomics. **Aquatic Toxicology**, v. 95, n. 3, p. 230–238, 2009.
- LIN, C.-R. et al. Prostaglandin E2 Receptor EP4 Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 3, p. 1096–1103, 2006.
- LOWRY, G. V. et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 5, p. 953–965, 2016.
- LUCAS, L.; RUSSELL, A.; KEAST, R. Molecular Mechanisms of Inflammation. Anti-Inflammatory Benefits of Virgin Olive Oil and the Phenolic Compound Oleocanthal. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 8, p. 754–768, 2011.
- M. S., J. D. G. et al. Lidocaine toxicity in primary afferent neurons from the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, n. 2, p. 413–421, 1998.
- MACRAE, C. A.; PETERSON, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Publishing Group**, v. 14, 2015.
- MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165–96, 2001.
- MALAMED, S. **ARTICAINE 30 Years Later**. Disponível em: <<https://www.oralhealthgroup.com/features/1003919408/>>. Acesso em: 13 abr. 2020.
- MALAMED, S. F. **Handbook of local anesthesia**. Elsevier, 2013.

- MALAMED, S. F.; GAGNON, S.; LEBLANC, D. Efficacy of articaine: A new amide local anesthetic. **Journal of the American Dental Association**, v. 131, n. 5, p. 635–642, 2000.
- MARKLEY, J. L. et al. The future of NMR-based metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 43, p. 34–40, 2017.
- MARTÍ-CARVAJAL, A. J. et al. **Prophylactic lidocaine for myocardial infarction**. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2015.
- MCCANN, G. Pharmacological treatment of significant cardiac arrhythmias. **British Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 5, p. 401–402, 2000.
- MEDA, F. et al. Nerves control redox levels in mature tissues through Schwann cells and Hedgehog signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 24, n. 6, p. 299–311, 2016.
- MEDEIROS, R. C. A. et al. Subversion of Schwann cell glucose metabolism by *Mycobacterium leprae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 41, p. 21375–21387, 2016.
- MEECHAN, J. G. anaesthesia: How to overcome failed local anaesthesia. **British Dental Journal**, v. 186, n. 1, p. 15–20, 1999.
- MELA, L. Inhibition and Activation of Calcium Transport in Mitochondria. Effect of Lanthanides and Local Anesthetic Drugs. **Biochemistry**, v. 8, n. 6, p. 2481–2486, 1969.
- MELO, N. F. S. DE et al. Development of hydrophilic nanocarriers for the charged form of the local anesthetic articaine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 66–73, 2014.
- MELO, N. F. S. DE et al. Characterization of Articaine-Loaded Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Nanocapsules and Solid Lipid Nanoparticles in Hydrogels for Topical Formulations. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 6, p. 4428–4438, 2017.
- MENDES, L. P. et al. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 6, p. 1268–1274, 2015.
- MENDYK, A. et al. KinetDS: An Open Source Software for Dissolution Test Data Analysis. **Dissolution Technologies**, p. 6–11, 2012.
- MENSE, S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. **The American journal of medicine**, v. 75, n. 5A, p. 4–14, 1983.
- MILLER, K. E.; RICHARDS, B. A.; KRIEBEL, R. M. Glutamine-, glutamine synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase-immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve. **Brain Research**, v. 945, n. 2, p. 202–211, 2002.
- MILLER, R. D. et al. **Miller's anesthesia**. Elsevier Health Sciences, 2014.
- MONTEIRO, M. R. F. P. et al. 4% articaine buccal infiltration versus 2% lidocaine inferior alveolar nerve block for emergency root canal treatment in mandibular molars with irreversible pulpitis: a randomized clinical study. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 2, p. 145–152, 2015.

- MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; INMAN, A. O.; ZHANG, L. W. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 234, n. 2, p. 222–235, 2009.
- MOOZ, E. D. et al. Physical and chemical characterization of the pulp of different varieties of avocado targeting oil extraction potential. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 2, p. 274–280, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MULLEN, P. PARP cleavage as a means of assessing apoptosis. **Methods in molecular medicine**, v. 88, p. 171–181, 2004.
- MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. SUPPL., p. 131–155, 2002.
- NAGENDRABABU, V. et al. Is articaine more effective than lidocaine in patients with irreversible pulpitis? An umbrella review. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 2, p. 200–213, 2020.
- NAHAK, P. et al. Physicochemical studies on local anaesthetic loaded second generation nanolipid carriers. **RSC Adv.**, v. 5, n. 33, p. 26061–26070, 2015.
- NANTEL, F. et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 4, p. 853–859, 1999.
- NAPIMOGA, M. H. et al. 15d-Prostaglandin J2 Inhibits Inflammatory Hypernociception: Involvement of Peripheral Opioid Receptor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 1, p. 313–321, 2007.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principle of Biochemistry 4 edition. In: **Worth**. [s.l.] Worth, 2006. p. 343–367.
- NEMTSAS, P. et al. Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 1, p. 161–171, 2010.
- NEUPANE, Y. R. et al. Lipid based nanocarrier system for the potential oral delivery of decitabine: Formulation design, characterization, ex vivo, and in vivo assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 601–612, 2014.

- NICOLSON, G. L.; SMITH, J. R.; POSTE, G. Effects of local anesthetics on cell morphology and membrane-associated cytoskeletal organization in BALB/3T3 cells. **Journal of Cell Biology**, v. 68, n. 2, p. 395–402, 1976.
- NOUETTE-GAULAIN, K. et al. Erythropoietin protects against local anesthetic myotoxicity during continuous regional analgesia. **Anesthesiology**, v. 110, n. 3, p. 648–659, 2009.
- NOUETTE-GAULAIN, K. et al. From analgesia to myopathy: When local anesthetics impair the mitochondrion. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 43, n. 1, p. 14–19, 2011.
- OLESTI, E. et al. Approaches in metabolomics for regulatory toxicology applications. **Analyst**, v. 146, n. 6, p. 1820–1834, 2021.
- ONAL, O.; SALTALI, A. O.; APILIOGULLARI, S. Comments on “Local Anesthetic Systemic Toxicity.” **Aesthetic Surgery Journal**, v. 36, n. 1, p. NP37–NP37, 2016.
- PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, n. 1–2, p. 170–184, 2009.
- PATIL, K. R.; PATIL, C. R. Anti-inflammatory activity of bartogenic acid containing fraction of fruits of *Barringtonia racemosa* Roxb. in acute and chronic animal models of inflammation. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 1, p. 86–93, 2017.
- PEREZ-CASTRO, R. et al. Cytotoxicity of Local Anesthetics in Human Neuronal Cells. **Anesthesia & Analgesia**, v. 108, n. 3, p. 997–1007, 2009.
- PETERS, M. C.; BOTERO, T. M. In Patients with Symptomatic Irreversible Pulpitis, Articaine is 3.6 Times More Efficacious Than Lidocaine in Achieving Anesthetic Success When Used for Supplementary Infiltration After Mandibular Block Anesthesia. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 17, n. 2, p. 99–101, 2017.
- PLOCK, N.; KLOFT, C. Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 1–24, 2005.
- POTOCNIK, I.; BAJROVIĆ, F. Failure of inferior alveolar nerve block in endodontics. **Endodontics & dental traumatology**, v. 15, n. 6, p. 247–51, 1999.
- PRADHAN, M. et al. Design, characterization and skin permeating potential of Fluocinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. **Steroids**, v. 101, p. 56–63, 2015.
- PRATES, É. T. et al. Articaine interaction with phospholipid bilayers. **Journal of Molecular Structure**, v. 1222, 2020.

- PUGLIA, C. et al. Development, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of benzocaine- and lidocaine-loaded nanostructured lipid carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 5, p. 1892–1899, 2011.
- PUGLIA, C. et al. Lipid Nanoparticles and Active Natural Compounds: A Perfect Wedding for Pharmaceutical Applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 24, p. 4681–4696, 2019.
- PYLATIUK, C. et al. Automatic zebrafish heartbeat detection and analysis for zebrafish embryos. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 379–383, 2014.
- RADAIC, A. et al. Studying the interactions between nanoparticles and biological systems. **Quimica Nova**, v. 39, n. 10, p. 1236–1244, 2016.
- RADWAN, I. A. M.; SAITO, S.; GOTO, F. The Neurotoxicity of Local Anesthetics on Growing Neurons: A Comparative Study of Lidocaine, Bupivacaine, Mepivacaine, and Ropivacaine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 94, n. 2, p. 319–324, 2002.
- RAGSDALE, D. S. et al. Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5179, p. 1724–1728, 1994.
- RAGSDALE, D. S. et al. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 17, p. 9270–5, 1996.
- RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 127–137, 2010.
- REIS, S. et al. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 177, 2013.
- RENSHAW, S. A. et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. **Blood**, v. 108, p. 3976–3978, 2006.
- RIBEIRO, L. N. M. et al. Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 192–202, 2016.
- RIBEIRO, L. N. M. et al. Natural lipid-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. May, p. 102–112, 2017.
- RICH, V. I.; KONSTANTINIDIS, K.; DELONG, E. F. Design and testing of “genome-proxy” microarrays to profile marine microbial communities. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 506–521, 2008.
- RIDOLFI, D. M. et al. In vitro cytotoxicity assays of solid lipid nanoparticles in epithelial and dermal cells. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 304, p. 012032, 2011.

- RIPPS, H.; SHEN, W. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2673–2686, 2012.
- ROCHA, A. P. C. et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94–105, 2007.
- RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Optimised NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of bupivacaine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 253–263, 2017.
- RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Designed for Dentistry, Articaine in NLC Improves Anaesthesia at Inflamed Tissues. **Proceedings of the 5th World Congress on Recent Advances in Nanotechnology**, 2020a.
- RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Injectable in situ forming nanogel: A hybrid Alginate-NLC formulation extends bupivacaine anesthetic effect. **Materials Science and Engineering: C**, v. 109, p. 110608, 2020b.
- RODRIGUES DA SILVA, G. H. et al. Articaine in functional NLC show improved anesthesia and anti-inflammatory activity in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 19733, 2020c.
- ROSENBLAT, G. et al. Polyhydroxylated fatty alcohols derived from avocado suppress inflammatory response and provide non-sunscreen protection against UV-induced damage in skin cells. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 4, p. 239–246, 2011.
- RSC96 cell line**. Disponível em: <<https://taiclone.com/product/256698/rsc96>>. Acesso em: 5 jun. 2022.
- RUAS, J. S. et al. High glycolytic activity of tumor cells leads to underestimation of electron transport system capacity when mitochondrial ATP synthase is inhibited. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2018.
- RUKTANONCHAI, U. et al. The effect of cetyl palmitate crystallinity on physical properties of gamma-oryzanol encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 19, n. 9, p. 095701, 2008.
- RUST, R. S. et al. Enzyme levels in cultured astrocytes, oligodendrocytes and Schwann cells, and neurons from the cerebral cortex and superior cervical ganglia of the rat. **Neurochemical Research**, v. 16, n. 9, p. 991–999, 1991.
- RYAN, D.; ROBARDS, K. Metabolomics: The greatest omics of them all? **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 23, p. 7954–7958, 2006.
- SANTAMARIA, C. M. et al. Drug delivery systems for prolonged duration local anesthesia. **Materials Today**, v. 20, n. 1, p. 22–31, 2017.

- SCHÖLER, N. et al. Preserved solid lipid nanoparticles (SLN) at low concentrations do cause neither direct nor indirect cytotoxic effects in peritoneal macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 235–239, 2000.
- SCHOLZ, A. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. **British Journal of Anaesthesia**, v. 89, n. 1, p. 52–61, 2002.
- SCHWARZ, C. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. **Journal of Controlled Release**, v. 30, n. 1, p. 83–96, abr. 1994.
- SEVERINO, P. et al. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of drug delivery**, v. 2012, p. 750891, 2012.
- SEWARD, G. R. **Handbook of local anesthesia**. Elsevier, 1981. v. 9
- SHINDE, RAJSHREE L.; JINDAL, ANIL B.; DEVARAJAN, P. V. Microemulsions and Nanoemulsions for Targeted Drug Delivery to the Brain. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 1, p. 119–133, 2011.
- SIEBER, S. et al. Zebrafish as an early stage screening tool to study the systemic circulation of nanoparticulate drug delivery systems in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 264, p. 180–191, 2017.
- SILVA, G. H. R. DA et al. Comparative Metabolomics Study of the Impact of Articaine and Lidocaine on the Metabolism of SH-SY5Y Neuronal Cells. **Metabolites 2022, Vol. 12, Page 581**, v. 12, n. 7, p. 581, 2022.
- SINNOTT, C. J.; STRICHARTZ, G. R. Levobupivacaine versus ropivacaine for sciatic nerve block in the rat. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 28, n. 4, p. 294–303, 2003.
- SKIBA, P. J. et al. The distal pathway of lipoprotein-induced cholesterol esterification, but not sphingomyelinase-induced cholesterol esterification, is energy-dependent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 23, p. 13392–13400, 1996.
- STIRRUP, P.; CREAN, S. Does articaine, rather than lidocaine, increase the risk of nerve damage when administered for inferior alveolar nerve blocks in patients undergoing local anaesthesia for dental treatment? A mini systematic review of the literature. **British Dental Journal**, v. 226, n. 3, p. 213–223, 2019.
- SUN, F. F.; FLEMING, W.; TAYLOR, B. M. Degradation of membrane phospholipids in the cultured human astroglial cell line UC-11MG during ATP depletion. **Biochemical Pharmacology**, v. 45, n. 5, p. 1149–1155, 1993.
- TARABALLI, F. et al. Potential avoidance of adverse analgesic effects using a biologically “smart” hydrogel capable of controlled bupivacaine release. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 103, n. 11, p. 3724–32, 2014.

- TERADA, H. et al. Effects of the local anesthetic bupivacaine on oxidative phosphorylation in mitochondria: Change from decoupling to uncoupling by formation of a leakage type ion pathway specific for H<sup>+</sup> in cooperation with hydrophobic anions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 14, p. 7837–7842, 1990.
- TSACOPOULOS, M. et al. Glial cells transform glucose to alanine, which fuels the neurons in the honeybee retina. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 3 I, p. 1339–1351, 1 mar. 1994.
- UENO, T. et al. Local anesthetic failure associated with inflammation: verification of the acidosis mechanism and the hypothetic participation of inflammatory peroxynitrite. **Journal of Inflammation Research**, v. 1, p. 41, 2008a.
- UENO, T. et al. Peroxynitrite affects lidocaine by acting on membrane-constituting lipids. **Journal of Anesthesia**, v. 22, n. 4, p. 475–478, 2008b.
- ULLOA, P. E. et al. Lactoferrin Decreases the Intestinal Inflammation Triggered by a Soybean Meal-Based Diet in Zebrafish. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–10, 2016.
- UNGERSTEDT, U. Microdialysis—principles and applications for studies in animals and man. **Journal of Internal Medicine**, v. 230, n. 4, p. 365–373, 1991.
- VALENTIM, A. M. et al. A new anaesthetic protocol for adult zebrafish (*Danio rerio*): Propofol combined with lidocaine. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.
- VAN POMEREN, M. et al. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. **Aquatic Toxicology**, v. 190, p. 40–45, 2017.
- VEIGA, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne? A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248–254, 2007.
- VIADER, A. et al. Aberrant schwann cell lipid metabolism linked to mitochondrial deficits leads to axon degeneration and neuropathy. **Neuron**, v. 77, n. 5, p. 886–898, 2013.
- VIRDEE, S. S.; SEYMOUR, D.; BHAKTA, S. Effective anaesthesia of the acutely inflamed pulp: part 1. The acutely inflamed pulp. **British Dental Journal** 2015 219:8, v. 219, n. 8, p. 385–390, 2015.
- VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 391–399, 2004.
- WANG, H.-W. et al. Amide-linked local anesthetics induce apoptosis in human non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8, n. 10, p. 2748–2757, 2016.
- WARDHANA; SURACHMANTO, E. S.; DATAU, E. A. The role of omega-3 fatty acids contained in olive oil on chronic inflammation. **Acta medica Indonesiana**, v. 43, n. 2, p. 138–143, 2011.

- WELDER, A. A. A primary culture system of adult rat heart cells for the evaluation of cocaine toxicity. **Toxicology**, v. 72, n. 2, p. 175–187, 1992.
- WERDEHAUSEN, R. et al. Lidocaine Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway Independently of Death Receptor Signaling. **Anesthesiology**, v. 107, n. 1, p. 136–143, 1 jul. 2007.
- WERDEHAUSEN, R. et al. Lipophilicity but not stereospecificity is a major determinant of local anaesthetic-induced cytotoxicity in human T-lymphoma cells. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 29, n. 1, p. 35–41, 2012.
- WILLIAMS, N. C.; O'NEILL, L. A. J. A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 141, 2018.
- WU, T. et al. Cytotoxicity of Local Anesthetics in Mesenchymal Stem Cells. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 97, n. 1, p. 50–55, 2018.
- YANG, S. et al. Local anesthetic Schwann cell toxicity is time and concentration dependent. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 36, n. 5, p. 444–451, 2011.
- YANG, Y. et al. Amino Acids in Endoplasmic Reticulum Stress and Redox Signaling. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1332, p. 35–49, 2021.
- YANTY, N. A. M.; MARIKKAR, J. M. N.; CHE MAN, Y. B. Effect of fractional crystallization on composition and thermal characteristics of avocado (*Persea americana*) butter. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 2203–2209, 2013.
- YERUERL, G. et al. Influence of surfactants on the physical stability (SLN) formulations of Solid Lipid Nanoparticle. p. 8–9, 2001.
- ZHANG, A. et al. Anesthetic Efficiency of Articaine Versus Lidocaine in the Extraction of Lower Third Molars: A Meta-Analysis and Systematic Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 77, n. 1, p. 18–28, 2019.
- ZHUANG, H. et al. Local anesthetics induce autophagy in young permanent tooth pulp cells. **Cell Death Discovery** 2015 1:1, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2015.
- ZUÑIGA-TRASLAVIÑA, C. et al. Cxcl8b and Cxcr2 Regulate Neutrophil Migration through Bloodstream in Zebrafish. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–11, 2017.
- ZWINGMANN, C. et al. NMR spectroscopic study on the metabolic fate of [3-13C] alanine in astrocytes, neurons, and cocultures: Implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism. **Glia**, v. 32, n. 3, p. 286–303, 2000.

## **VI. ANEXOS**

### **1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO**

#### **1.1. ARTIGOS PUBLICADOS**

##### **1.1.1 Provenientes da tese de doutorado / linha de pesquisa**

1. Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Mendes, Luís F.; de Carvalho, Fabíola V.; de Paula, Eneida; Duarte, Iola F. Comparative Metabolomics Study of the Impact of Articaine and Lidocaine on the Metabolism of SH-SY5Y Neuronal Cells. **Metabolites**, v. 12, p. 581, 2022.

2. Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Moura, Ludmilla David De; Carvalho, Fabíola Vieira De; Geronimo, Gabriela; Mendonça, Talita Cesarim; Lima, Fernando Freitas De; De Paula, Eneida. Antineoplastics Encapsulated in Nanostructured Lipid Carriers. **Molecules**, v. 26, p. 6929, 2021.

3. Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Lemes, Julia Borges Paes; Geronimo, Gabriela; Freitas De Lima, Fernando; De Moura, Ludmilla David; Carvalho Dos Santos, Ariany; Carvalho, Nathalia Santos; Malange, Kauê Franco; Breitzkreitz, Márcia C.; Parada, Carlos A.; de Paula, Eneida. Lipid nanoparticles loaded with butamben and designed to improve anesthesia at inflamed tissues. **Biomaterial Science**, v. 1, p. 1, 2021.

4. Geronimo, Gabriela\*; Rodrigues da Silva, Gustavo H.\*; Moura, Ludmilla D.; Ribeiro, Lígia N. M.; Guilherme, Viviane A.; Mendonça, Talita C.; Castro, Simone R.; Breitzkreitz, Márcia C.; De Paula, Eneida. Development of S75:R25 bupivacaine-loaded lipid nanoparticles functionalized with essential oils for treating melanoma. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 1, p. 1, 2021. \*primeiros autores

5. Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Geronimo, Gabriela; García-López, Juan P.; Ribeiro, Lígia N. M.; De Moura, Ludmilla D.; Breitzkreitz, Márcia C.; Feijóo, Carmen G.; De Paula, Eneida. Articaine in functional NLC show improved anesthesia and anti-inflammatory activity in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 10, p. 19733, 2020.

6. Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Geronimo, Gabriela; Ribeiro, Lígia N.M.; Guilherme, Viviane A.; De Moura, Ludmilla David; Bombeiro, André L.; Oliveira, Juliana Damasceno; Breitzkreitz, Márcia C.; De Paula, Eneida. Injectable in situ forming nanogel: A hybrid Alginate-NLC

formulation extends bupivacaine anesthetic effect. **Material Science & Engineering C-Material for Biological Applications**, v. 109, p. 110608, 2020.

7. Prates, Érica Teixeira; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Souza, Thais F.; Skaf, Munir S.; Pickholz, Mónica; de Paula, Eneida. Articaine interaction with phospholipid bilayers. **Journal of Molecular Structure**, v.1222, p.128854, 2020.

### 1.1.2 Artigos em colaboração

1.Malherbi, Naiane Miriam; Grando, Remili Cristiani; Fakhouri, Farayde Matta; Velasco, José Ignacio; Tormen, Luciano; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Yamashita, Fábio; Bertan, Larissa Canhadas. Effect of the addition of Euterpe oleracea Mart. extract on the properties of starch-based sachets and the impact on the shelf-life of olive oil. **Food Chemistry**, v. 394, p. 133503, 2022.

2.Bonetti, Flávia Monique Rocha; de Paula, Eneida; Fonseca, Belchiolina Beatriz; da Silva, Gabriela Ribeiro; da Silva, Leandro Santana Soares; de Moura, Ludmilla David; Breitreitz, Márcia Cristina; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; de Moraes Ribeiro, Lígia Nunes. Hybrid Nanobeads for Oral Indomethacin Delivery. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 583, 2022.

3. Castro, Simone R.; Ribeiro, Lígia N. M.; Breitreitz, Márcia C.; Guilherme, Viviane A.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Mitsutake, Hery; Alcântara, Ana C. S.; Yokaichiya, Fabiano; Franco, Margareth K. K. D.; Clemens, Daniel; Kent, Ben; Lancellotti, Marcelo; De Araújo, Daniele R.; De Paula, Eneida. A pre-formulation study of tetracaine loaded in optimized nanostructured lipid carriers. **Scientific Reports** 11, 21463, 2021.

4.Mitsutake, Hery; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Ribeiro, Lígia; de Paula, Eneida; Poppi, Ronei; Rutledge, Douglas; Breitreitz, Márcia. Raman Imaging and Chemometrics Evaluation of Natural and Synthetic Beeswaxes as Matrices for Nanostructured Lipid Carriers Development. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry - BrJAC (Online)**, v. 8, p. 00, 2021.

5.Cordeiro Lima Fernandes, Priscila; David de Moura, Ludmilla; Freitas de Lima, Fernando; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Isaias Carvalho Souza, Roosevelt; de Paula, Eneida. Lipid nanocapsules loaded with prilocaine and lidocaine and incorporated in gel for topical application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 602, p. 120675, 2021.

6.Freitas de Lima, Fernando; da Silva, Bianca Brandão; Oliveira, Juliana Damasceno; de Moura, Ludmilla David; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Fernandes, Priscila Cordeiro Lima; Souza, Roosevelt Isaias Carvalho; dos Santos, Ariany Carvalho; de Paula, Eneida. Prolonged anesthesia and decreased toxicity of enantiomeric-excess bupivacaine loaded in ionic gradient liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 606, p. 120944, 2021.

7.Pinto, Ricardo J. B.; Lameirinhas, Nicole S.; Guedes, Gabriela; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Oskoei, Párastu; Spirk, Stefan; Oliveira, Helena; Duarte, Iola F.; Vilela, Carla; Freire, Carmen S. R. Cellulose Nanocrystals/Chitosan-Based Nanosystems: Synthesis, Characterization, and Cellular Uptake on Breast Cancer Cells. **Nanomaterials**, v. 11, p. 2057, 2021.

Citações:4

8.de Moura, Ludmilla David; Ribeiro, Lígia N. M.; de Carvalho, Fabíola V.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Lima Fernandes, Priscila C.; Brunetto, Sérgio Q.; Ramos, Celso D.; Velloso, Lício A.; de Araújo, Daniele R.; de Paula, Eneida. Docetaxel and Lidocaine Co-Loaded (NLC-in-Hydrogel) Hybrid System Designed for the Treatment of Melanoma. **Pharmaceutics**, v. 13, p. 1552, 2021.

9.Ribeiro, Lígia N. M.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Couto, Verônica M.; Castro, Simone R.; Breitzkreitz, Márcia C.; Martinez, Carolina S.; Igartúa, Daniela E.; Prieto, Maria J.; de Paula, Eneida. Functional Hybrid Nanoemulsions for Sumatriptan Intranasal Delivery. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 589503, 2020.

10. Santos, M. M.; Borges, A. B. A.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Oliveira, W. S. Analysis of the Use of Clickers in an Electrochemistry and Corrosion Course. **International journal of engineering research and applications**, v. 10, p. 1-8, 2020.

11. Ribeiro, Lígia N. M.; Franz-Montan, Michelle; Alcântara, Ana C. S.; Breitzkreitz, Márcia C.; Castro, Simone R.; Guilherme, Viviane A.; Muniz, Bruno V.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; de Paula, Eneida. Hybrid nanofilms as topical anesthetics for pain-free procedures in dentistry. **Scientific Reports**, v. 10, p. 11341, 2020.

12. Ribeiro, Lígia N. M.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Couto, Verônica M.; Castro, Simone R.; Breitzkreitz, Márcia C.; Martinez, Carolina S.; Igartúa, Daniela E.; Prieto, Maria J.; de Paula,

Eneida. Functional Hybrid Nanoemulsions for Sumatriptan Intranasal Delivery. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 589503, 2020.

13. Albano, Juan M.R; Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes; Couto, Verônica Muniz; Barbosa Messias, Mariana; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Breitzkreitz, Márcia Cristina; de Paula, Eneida; Pickholz, Monica. Rational design of polymer-lipid nanoparticles for docetaxel delivery. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 175, p. 56-64, 2019.

14. Guilherme, Viviane A.; Ribeiro, Lígia N. M.; Alcântara, Ana C. S.; Castro, Simone R.; Rodrigues da Silva, Rodrigues da Silva, Gustavo H., Camila Gonçalves; Breitzkreitz, Márcia C.; Clemente-Napimoga, Juliana; Macedo, Cristina G.; Abdalla, Henrique B.; Bonfante, Ricardo; Cereda, Cintia M. S.; de Paula, Eneida. Improved efficacy of naproxen-loaded NLC for temporomandibular joint administration. **Scientific Reports**, v. 9, p. 11160, 2019.

15. Mitsutake, Hery; Ribeiro, Lígia N.M.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Castro, Simone R.; de Paula, Eneida; Poppi, Ronei J.; Breitzkreitz, Márcia C. Evaluation of miscibility and polymorphism of synthetic and natural lipids for nanostructured lipid carrier (NLC) formulations by Raman mapping and multivariate curve resolution (MCR). **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 135, p. 51-59, 2019.

16. Oliveira, Juliana Damasceno; Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Casadei, Bruna Renata; Couto, Verônica Muniz; Martinez, Elizabeth Ferreira; de Paula, Eneida. Sustained Release from Ionic-Gradient Liposomes Significantly Decreases ETIDOCAINE Cytotoxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 35, p. 229, 2018.

17. Ribeiro, Lígia Nunes De Moraes; Franz-Montan, Michelle; Cristina Breitzkreitz, Márcia; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Ramos de Castro, Simone; Aparecida Guilherme, Viviane; de Araújo, Daniele Ribeiro; de Paula, Eneida. Nanohybrid hydrogels designed for transbuccal anesthesia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 6453-6463, 2018.

## 1.2. TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Lemes, Julia B. P; Geronimo, Gabriela; Duarte, Iola F.; Parada, Carlos A.; de Paula, Eneida. Designed for Dentistry, articaine in NLC Improves Anaesthesia at

Inflamed Tissues. **In: The 5th World Congress on Recent Advances in Nanotechnology**, 2020. DOI: 10.11159/nddte20.112.

### 1.3. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

1. Gerônimo, G; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Ribeiro, Lígia N. M.; De Paula, Eneida. Bupivacaine-loaded nanostructured lipid carriers prepared with beeswax, lavender or melaleuca oil: characterization and physico-chemical stability. In: Congresso iniciação científica da Unicamp, 2019, Campinas. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, 2018. v. 26.

2. Gerônimo, G; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Ribeiro, Lígia N. M.; De Castro, Simone Ramos; Breitzkreitz, Márcia Cristina; De Paula, Eneida. Optimization by factorial design of bupivacaine loaded nanostructured lipid carriers prepared with beeswax and melaleuca oil. **In: XIX Pharmaceutical Congress of São Paulo, 2017, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017. v. 53. p. 159.

3. Mendonça, T. C.; De Castro, Simone Ramos; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Ribeiro, Lígia N. M.; Machado, D.; De Paula, Eneida. Cytotoxicity evaluation of tetracaine-loaded nanostructured lipid carriers. **In: XIX Pharmaceutical Congress of São Paulo, 2017, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017. v. 53. p. 128.

4. Geronimo, Gabriela; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Nunes de Moraes Ribeiro, Lígia; Breitzkreitz, Márcia Cristina; de Paula, Eneida. Bupivacaine-loaded nanoparticulated lipid carriers prepared with beeswax and melaleuca oil aiming the treatment of burn injuries: *in vitro* release study. **In: XXV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp**, 2017, Campinas, 2017.

5. Couto, Verônica M.; Casadei, Bruna Renata; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Riske, K. A.; Oliveira, L; de Paula, Eneida. Capsaicin and local anesthetics interaction with model membranes. In: 19th IUPAB and 11th EBSA Congress, 2017, Edinburgh, Scotland. **European Biophysics Journal**, 2017. v. 46. p. S301-S301.

6. Mendonça, T. C.; de Castro, Simone Ramos; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Ribeiro, Lígia N. M.; de Paula, Eneida. Influence of lipid and surfactant components on the features and stability

of solid lipid nanoparticles. **In: XIX Pharmaceutical Congress of São Paulo, 2017, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017. v. 53. p. 154.

#### 1.4 APRESENTAÇÕES DE TRABALHO

1. Geronimo, Gabriela; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Moura, L. D.; de Paula, Eneida. Bupivacaine loaded in nanostructured lipid carriers prepared with lavender oil: improved cytotoxicity against melanoma cell lines. 2020.
2. de Moura, Ludmilla David; Ribeiro, L.N.M.; Carvalho, F. V.; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Cordeiro, Priscila; Lima, F. F.; Araújo, D; de Paula, Eneida. Desenvolvimento de um sistema híbrido nanostruturado com função-dual para o tratamento de melanoma. 2020.
3. Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique. Nanofarmacologia Aplicada a Nanomedicina. 2020.
4. Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Mendes, L.; Moura, L. D.; Eneida de Paula; Duarte, I. F. Differential Metabolic Effects Of Articaine And Lidocaine In Schwann Cells. 2020.
5. Breitreitz, M. C.; Mitsutake, Hery; Ribeiro, L.N.M.; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Castro, Simone R.; Eneida de Paula; Poppi, Ronei J.; Rutledge, D. N. Raman Imaging and Chemometrics Applied to The Study of Lipid Formulations: Miscibility, Structural Changes and Stability Prediction. 2019.
6. Mitsutake, Hery; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Ribeiro, Lígia N. M.; Eneida de Paula; Rutledge, D. N.; Poppi, Ronei J.; Breitreitz, Márcia Cristina. Diferenciação Entre Cera de Abelha Natural E Sintética Para Desenvolvimento de Nlc Usando Análise discriminante por Componentes Principais Independentes (Ic-Da). 2018.
7. Mitsutake, Hery; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Ribeiro, Lígia N. M.; de Paula, Eneida; Poppi, Ronei J.; Breitreitz, Márcia Cristina. Espectroscopia de Imagem Raman para comparação de Formulações Farmacêuticas contendo Cera de Abelha Natural e Sintética. 2018.
8. Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Geronimo, Gabriela; Ribeiro, Lígia N. M.; de Moura, Ludmilla David; Breitreitz, Márcia Cristina; de Paula, Eneida. Nanoparticle Tracking Analysis to Evaluate the Effect of Constituents on Nanostrutured Lipid Carriers. 2018.

9. Ribeiro, Lígia N.M.; Franz-Montan, Michelle; Alcantara, A.C S.; Guilherme, Viviane; Castro, Simone R.; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; de Paula, Eneida. Bioadesivo Nanoesteruturado Lipídico-Polímero Para Anestesia Tópica Em Mucosa Oral. 2018.
  
10. Mitsutake, Hery; da Silva, Gustavo Henrique Rodrigues; Castro, Simone R.; Ribeiro, Lígia N.M.; Oliveira, L; Beraldo, V.; Eneida de Paula; Poppi, Ronei J.; Breitzkreitz, M. C. Evaluation of Miscibility and Stability Prediction of Mixtures of Cetyl Palmitate and Several Liquid Lipids Used For Nanostructured Lipid Carriers Preparation Using Raman Mapping And Classical Least Squares (Cls). 2017.
  
11. da Silva, Gustavo H. R.; Ribeiro, Lígia N. M.; de Castro, Simone Ramos; Guilherme, Viviane; Breitzkreitz, Márcia Cristina; de Paula, Eneida. Ultra-Prolonged Anesthetic Effect of Bupivacaine Attained with A Hybrid Injectable In Situ-Forming Nanogel Formulation. 2017.
  
12. Ribeiro, Lígia N. M.; Franz-Montan, Michelle; Breitzkreitz, Márcia Cristina; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Castro, Simone R.; Guilherme, Viviane; Araujo, D.; de Paula, Eneida. Bio-Hybrid Nanostructured Hydrogels For Topical Anesthesia In Dentistry. 2017.
  
13. Castro, Simone R.; Ribeiro, Lígia N. M.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Guilherme, Viviane; Machado, Daisy; Lancelotti, M; Araujo, D.R.; de Paula, Eneida. Improvement of The Tetracaine Anesthetic Effect from Thermoreversible Hydrogels Containing Nanostructured Lipid Carriers. 2017.
  
14. Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Ribeiro, Lígia N. M.; de Paula, Eneida; Breitzkreitz, Márcia Cristina. Excipients Effect on Nanoparticle Concentration Using Factorial Design. 2017.
  
15. Dasmaceno, Juliana; Casadei, Bruna; Couto, Verônica M.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Ribeiro, Lígia N. M.; de Paula, Eneida. Development and Stability Tests of Ionic-Gradient Liposomes Designed as Drug-Delivery Systems For Etidocaine. 2017.
  
16. Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Geronimo, Gabriela; Ribeiro, Lígia N. M.; Breitzkreitz, Márcia Cristina; de Paula, Eneida. Evaluation Of Excipients Effect on Nanoparticle Concentration Using Factorial Design. 2017.

17. de Moura, Ludmilla David; Ribeiro, Lígia N. M.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; de Paula, Eneida. Nanostructured Lipid Carriers with Antitumor Action: Potential Application To Cancer Treatment. 2017.

18. Geronimo, Gabriela; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Ribeiro, Lígia N. M.; Castro, Simone R.; Breitzkreitz, Márcia Cristina; de Paula, Eneida. Optimization by Factorial Design of Bupivacaine Loaded Nanostructured Lipid Carriers Prepared with Beeswax And Melaleuca Oil. 2017.

19. Mendonça, T. C.; Castro, Simone R.; Ribeiro, Lígia N. M.; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; de Paula, Eneida. Influence of Lipid and Surfactant Components on the Features and Stability of Solid Lipid Nanoparticles. 2017.

20. Geronimo, Gabriela; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Ribeiro, Lígia N.M.; Breitzkreitz, Márcia Cristina; Castro, Simone R.; Guilherme, Viviane; de Paula, Eneida. Bupivacaine-Loaded Nanoparticles Lipid Carriers Prepared with Beewax and Melaleuca Oil Aiming The Treatment Of Burn Injuries. 2017.

21. Mendonça, T. C.; Castro, Simone R.; Ribeiro, Lígia N. M.; Rodrigues da Silva, Gustavo Henrique; Machado, Daisy; de Paula, Eneida. Citotoxicity Evaluation of Tetracaine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. 2017.

## **1.5 PATENTE**

1. Ribeiro, Lígia N. M.; de Paula, Eneida; Franz-Montan, Michelle; Castro, Simone R.; Moura, L. D.; Guilherme, V. A.; Rodrigues da Silva, Gustavo H.; Fraceto, L.F., Pascoli, M., Albuquerque, F.P.; Polanczyk, R.A.; Andrade, D.J., Damasio A.R.L., Rubio, M.V. Composição de carreadores lipídicos nanoestruturados naturais com intrínseca ação anestésica, bactericida, antifúngica e biopesticida. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190099216, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 10/05/2019

## **1.6 PROJETO DE EXTENSÃO**

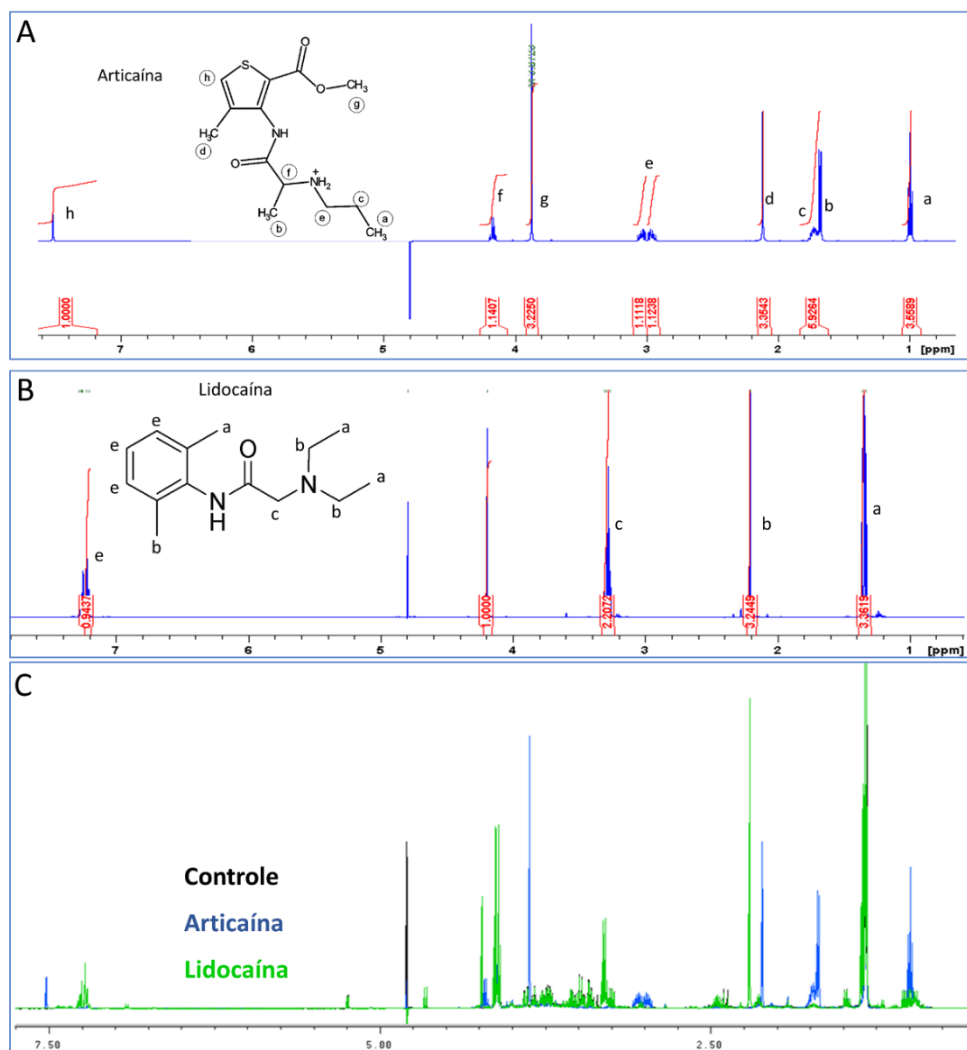
1. Curso de Introdução a Nanomedicina. Situação: Concluído (2020). Integrantes: Janine Karla França da Silva Braz - Coordenador / Gustavo Henrique Rodrigues da Silva - Integrante / Carlos

Eduardo Bezerra de Moura - Integrante / Julliane Tamara Araújo de Melo - Integrante / Raiane dos Santos Martins - Integrante / Brígida Gabriele Albuquerque Barra - Integrante / Jose Wilamy Cosme Rabelo - Integrante / Carla Laize dos Santos Cruz Costa - Integrante / Igor Zumba Damasceno - Integrante / Pamela Alejandra Naulin Gysling - Integrante / Maria Isabele Oliveira Sousa - Integrante / Alisson Costa de Araujo - Integrante. Financiador: Pro-Reitoria de Extensão Univeristária UFRN - Auxílio Financeiro.

### **1.7 ATIVIDADES PARALELAS DESENVOLVIDAS**

1. Participação no programa de estágio docente (PED), na disciplina de Bioquímica Básica (BB123), oferecida para alunos de Enfermagem/Unicamp, durante o 1º semestre 2018, 5 créditos.
2. Participação no programa de estágio docente (PED), nas aulas de bioquímica das disciplinas a célula (BS111), aparelho locomotor (BS123) e sistema cardiovascular (BS124), para a turma de primeiro ano de Medicina/Unicamp, durante o primeiro semestre de 2019.
3. Co-orientação da aluna de iniciação científica Gabriela Gerônimo (bolsista FAPESP) em seu projeto: Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas funcionais com bupivacaína visando tratamento de queimaduras (2017 - 2019).

## 2. MATERIAL SUPLEMENTAR



**Figura S1.** Espectros 1D RMN- $^1\text{H}$ . A) articaína, B, lidocaína, C) sobreposição dos espectros de 1D RMN- $^1\text{H}$  do meio DMEN controle (preto) com articaína (azul) e com lidocaína (verde) após exposição células de Schwann.

**Tabela S1.** Composição do meio DMEM (Sigma-Aldrich) utilizado nos experimentos com células de Schwann

| Componente                           | Concentração (g/L) |
|--------------------------------------|--------------------|
| <b>Sais inorgânicos</b>              |                    |
| Cloreto de cálcio                    | 0,2                |
| Nitrato férrico • 9H <sub>2</sub> O  | 0,0001             |
| Sulfato de magnésio                  | 0,09767            |
| Cloreto de potássio                  | 0,4                |
| Cloreto de sódio                     | 6,4                |
| Fosfato de sódio monobásico          | 0,109              |
| Bicarbonato de sódio                 | 3,7                |
| <b>Aminoácidos</b>                   |                    |
| L-Arginina • HCl                     | 0,084              |
| L-Cistina • 2HCl                     | 0,0626             |
| L-Glutamina                          | 0,584              |
| Glicina                              | 0,03               |
| L-Histidina • HCl • H <sub>2</sub> O | 0,042              |

| Componente                           | Concentração (g/L) |
|--------------------------------------|--------------------|
| L-Isoleucina                         | 0,105              |
| L-Leucina                            | 0,105              |
| L-Lisina • HCl                       | 0,146              |
| L-Metionina                          | 0,03               |
| L-Fenilalanina                       | 0,066              |
| L-Serina                             | 0,042              |
| L-Treonina                           | 0,095              |
| L-Triptofano                         | 0,016              |
| L-Tirosina • 2Na • 2H <sub>2</sub> O | 0,10379            |
| L-Valina                             | 0,094              |
| <b>Vitaminas</b>                     |                    |
| Cloridrato de Colina                 | 0,004              |
| Ácido fólico                         | 0,004              |
| mio-Inositol                         | 0,0072             |
| Niacinamida                          | 0,004              |
| D-Ácido pantatênico (hemi-cálcio)    | 0,004              |
| Piridoxal • HCl                      | 0,004              |
| Riboflavina                          | 0,0004             |
| Tiamina • HCl                        | 0,004              |
| <b>Outros</b>                        |                    |
| D-Glicose                            | 4,5                |
| Vermelho de fenol • Na               | 0,0159             |
| Ácido piruvico • Na                  | 0,11               |

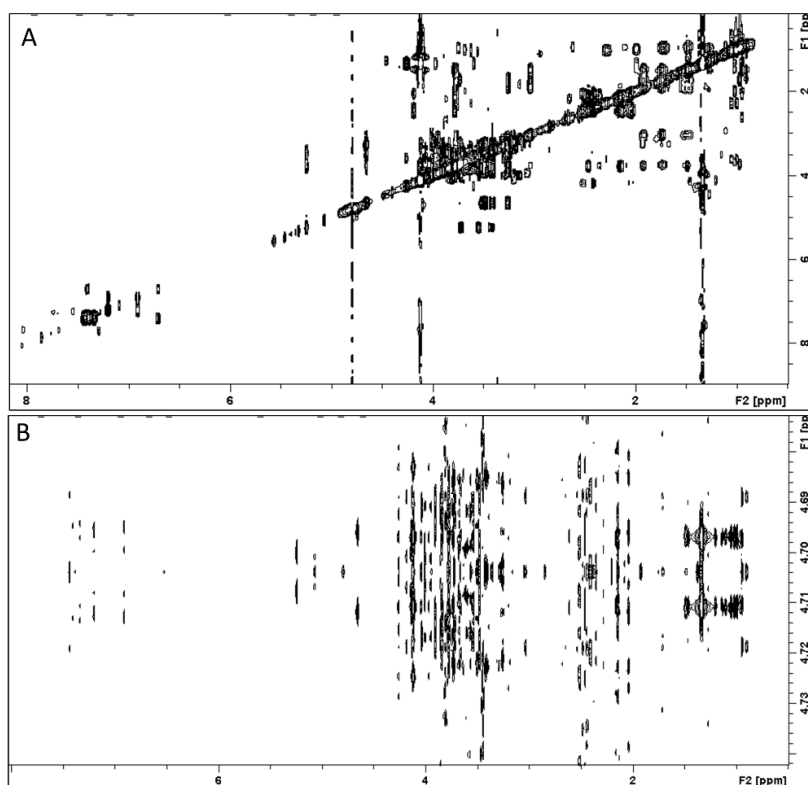


Figura S2. Espectros 2D RMN- $^1\text{H}$  do meio celular. A)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY e B) J-resolved.

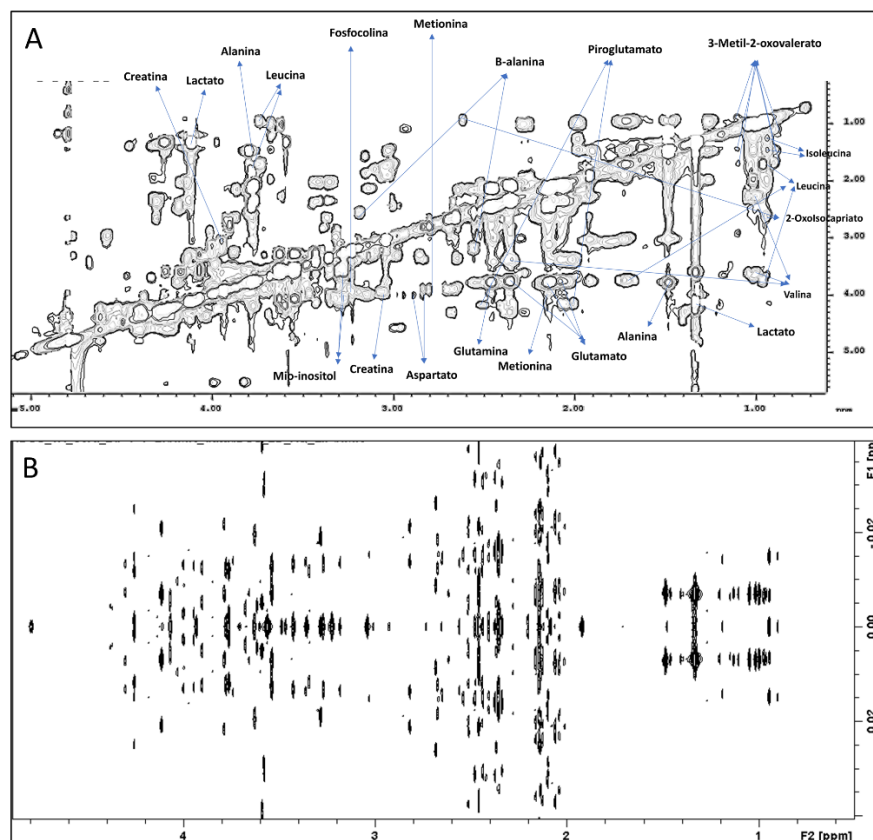


Figura S3. Espectros 2D RMN- $^1\text{H}$  do extrato polar. A)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY e B) J-resolved.

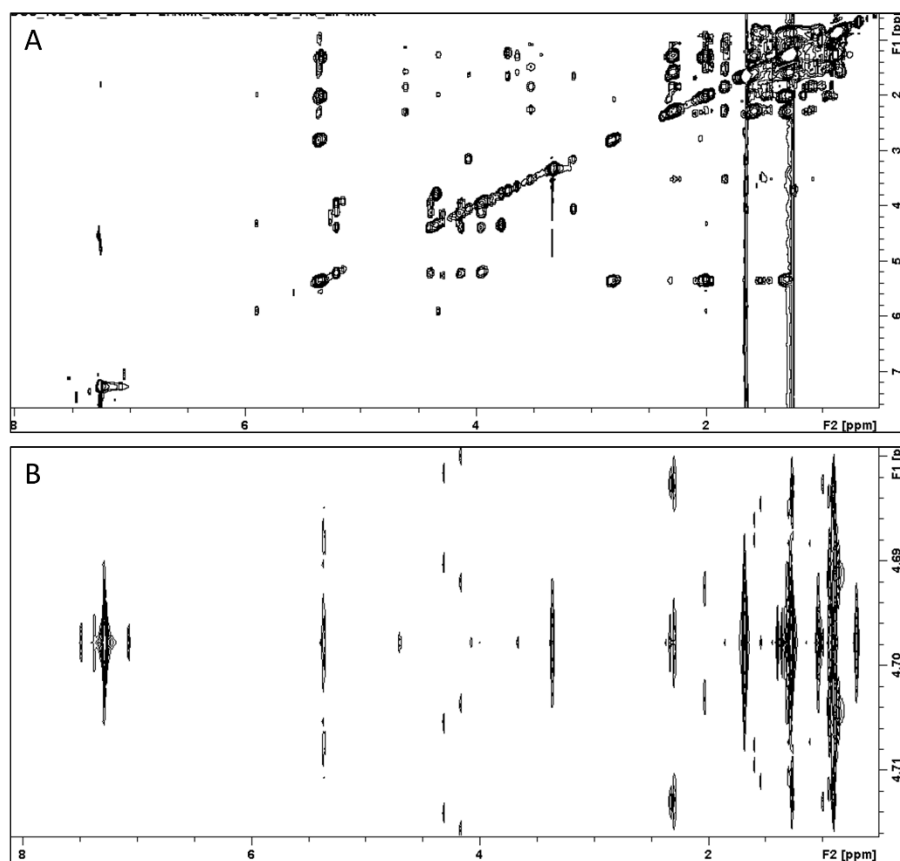
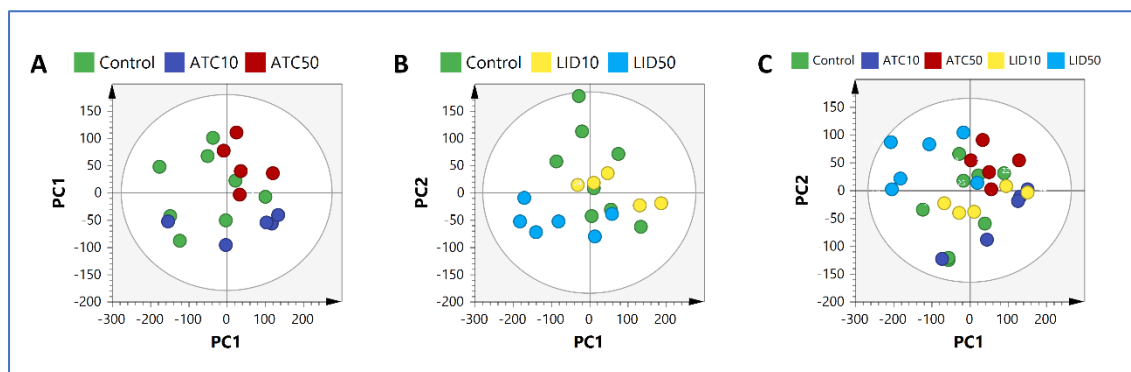


Figura S4. Espectros 2D RMN- $^1\text{H}$  do extrato lipídico. A)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY e B) J-resolved.



**Figura S4.** Análises multivariadas por PCA do extrato celular apolar de células de Schwann expostas: A, articaína, B, Lidocaína e C, todos os grupos.

**Tabela S2.** Atribuição dos picos de ressonâncias de  $^1\text{H}$ -RMN dos extratos polares e meios para células de Schwann. Multiplicidade: s, simpleto; d, duplete; t, tripleto; q, quarteto; m, multiplete; dd, duplete de dupletos; dt, duplete de tripletos; td, tripleto de quarteto.

| No. | Sigla | Composto              | $\delta$ $^1\text{H}$ em ppm (multiplicidade, atribuição)                                                                                                                                                                                              | Polar | Meio |
|-----|-------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|
| 1   | 2-IC  | 2-Oxoisocaproato      | 0.94 (d, $\text{CH}_3$ ); 2.09 (m, CH); 2.61 (d, $\text{CH}_2$ )                                                                                                                                                                                       | x     | x    |
| 2   | 3-MO  | 3-metil-2-oxovalerato | 0.89 (t, $\text{CH}_3$ ), 1.10 (d, $\text{CH}_3$ ), 1.46 (m, $\text{CH}_2$ ), 1.70 (m, $\text{CH}_2$ ), 2.93 (m, CH)                                                                                                                                   | x     | x    |
| 3   | 3-HB  | 3-Hidroxibutirato     | 1.24 (d, $\text{CH}_3$ ), 2.31 (dd, $\text{CH}_2$ ), 4.16 (m, CH)                                                                                                                                                                                      |       | x    |
| 4   |       | Acetato               | 1.92 (s, $\beta\text{-CH}_3$ )                                                                                                                                                                                                                         | x     | x    |
| 5   | ADP   | Adenosina difosfato   | 4.23 (m, $\text{C5}'\text{H}$ , ribose); 4.40 (m, $\text{C4}'\text{H}$ , ribose); 4.60 (m, $\text{C2}'\text{H}$ , ribose); 6.15 (d, $\text{C1}'\text{H}$ , ribose); 8.28 (s, C8H, anel); 8.53 (s, C2H, anel)                                           | x     |      |
| 6   | ATP   | Adenosina trifosfato  | 4.22 (m, $\text{C5}'\text{H}$ , ribose); 4.29 (m, $\text{C5}''\text{H}$ , ribose); 4.41 (m, $\text{C4}'\text{H}$ , ribose); 4.61 (m, $\text{C2}'\text{H}$ , ribose); 6.15 (d, $\text{C1}'\text{H}$ , ribose); 8.82 (s, C8H, anel); 8.53 (s, C2H, anel) | x     |      |
| 7   | Ala   | Alanina               | 1.48 (d, $\beta\text{-CH}_3$ ); 3.78 (q, $\alpha\text{-CH}$ )                                                                                                                                                                                          | x     | x    |
| 8   | Asp   | Aspartato             | 2.67 (dd, $\beta\text{-CH}$ ); 2.80 (dd, $\beta'\text{-CH}$ ); 3.90 (dd, $\alpha\text{-CH}$ )                                                                                                                                                          | x     |      |
| 9   | B-Ala | $\beta$ -alanina      | 2.6 (t, $\alpha\text{-CH}_2$ ); 3.2 (t, $\beta\text{-CH}_2$ )                                                                                                                                                                                          | x     |      |
| 10  |       | Citrato               | 2.536 (d, $\alpha\text{-CH}_2$ / $\beta\text{-CH}_2$ ); 2.662 (d, $\alpha'\text{-CH}_2$ / $\beta'\text{-CH}_2$ )                                                                                                                                       | x     |      |
| 11  | Cr    | Creatina              | 3.04 (s, $\text{CH}_3$ ); 3.93 (s, $\text{CH}_2$ )                                                                                                                                                                                                     | x     |      |
| 12  | Cho   | Colina                | 3.21 (s, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ )/56.5; 3.53 (m, $\text{CH}_2(\text{NH})$ ); 4.07 (m, $\text{CH}_2(\text{OH})$ )                                                                                                                                    | x     |      |
| 13  | Phe   | Fenilalanina          | 3.146 (m, $\beta\text{-CH}$ ); 3.280 (dd, $\beta'\text{-CH}$ ); 4.00 (m, $\alpha\text{-CH}$ ); 7.384 (d, C2H / C6H, anel); 7.39 (d, C4H, anel); 7.43 (t, C3H / C5H, anel)                                                                              | x     | x    |
| 14  |       | Formate               | 8.465 (s, CH)                                                                                                                                                                                                                                          | x     | x    |
| 15  | PC    | Fosfocolina           | 3.23 (s, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ); 3.62 (m, $\text{N-CH}_2$ ); 4.172 (m, $\text{PO}_3\text{-CH}_2$ )                                                                                                                                                | x     |      |
| 16  | PCr   | Fosfocreatina         | 3.04 (s, $\text{CH}_3$ ); 3.955 (s, $\text{CH}_2$ )                                                                                                                                                                                                    | x     |      |
| 17  |       | Fumarato              | 6.526 (s, CH)                                                                                                                                                                                                                                          | x     | x    |
| 18  | Glc   | Glicose               | 3.239 (dd, C3H); 3.405 (m, C5H); 3.464 (m, C6H); 3.535 (dd, C3H); 3.72 (m, C4H, C11H); 3.827 (m, C6H, C11H); 3.895 (dd, C11H); 4.658 (d, C2H); 5.235 (d, C2H)                                                                                          |       | x    |
| 19  | Glu   | Glutamato             | 2.044 (m, $\beta\text{-CH}$ ); 2.12 ( $\beta'\text{-CH}$ ); 2.333 (m, $\gamma\text{-CH}_2$ ); 3.77 (dd, $\alpha\text{-CH}$ )                                                                                                                           | x     | x    |

|    |       |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |   |   |
|----|-------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|
| 20 | Gln   | Glutamina                                  | 2.142 (m, $\beta$ -CH <sub>2</sub> ); 2.454 (m, $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ); 3.78 (t, $\alpha$ -CH)                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | x | x |
| 21 | Gly   | Glicina                                    | 3.575 (s, $\alpha$ -CH <sub>2</sub> )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | x | x |
| 22 | GPC   | Glicerofosfocolina                         | 3.24 (s, N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ); 3.675 (m, $\beta'$ -CH <sub>2</sub> (N) / $\gamma$ -CH <sub>2</sub> (OH)); 3.917 (s, $\alpha$ -CH <sub>2</sub> / $\beta$ -CH <sub>2</sub> ); 4.326 (m, $\alpha'$ -CH <sub>2</sub> (P))                                                                                                                                                                        | x |   |
| 23 | His   | Histidina                                  | 3.232 (m, $\beta$ -CH <sub>2</sub> ); 4.00 (m, $\alpha$ -CH <sub>2</sub> ); 7.165 (s, C <sub>4</sub> H, anel); 8.072 (s, C <sub>2</sub> H, anel)                                                                                                                                                                                                                                                           | x | x |
| 24 | Ile   | Isoleucina                                 | 0.944 (t, $\delta$ -CH <sub>3</sub> ); 1.013 (d, $\beta$ -CH <sub>3</sub> ); 1.258 (m, $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ); 1.470 (m, $\gamma'$ -CH <sub>2</sub> ); 1.984 (m, $\beta$ -CH); 3.673 (d, $\alpha$ -CH)                                                                                                                                                                                                | x | x |
| 25 |       | Lactato                                    | 1.329 (d, $\beta$ -CH <sub>3</sub> ); 4.125 (q, $\alpha$ -CH)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | x | x |
| 26 | Leu   | Leucina                                    | 0.963 (t, $\delta$ -CH <sub>3</sub> ); 1.699 (m, $\gamma$ -CH / $\beta$ -CH <sub>2</sub> ); 3.736 (m, $\alpha$ -CH)                                                                                                                                                                                                                                                                                        | x | x |
| 27 | Lys   | Lisina                                     | 1.47 (m, $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ); 1.73 (m, $\delta$ -CH <sub>2</sub> ); 1.92 (m, $\beta$ -CH <sub>2</sub> ); 3.03 (t, $\epsilon$ -CH <sub>2</sub> ); 3.76 (t, $\alpha$ -CH)                                                                                                                                                                                                                            | x |   |
| 28 | Met   | Metionina                                  | 2.14 (s, $\beta$ -CH <sub>2</sub> ); 2.16 (t, $\beta$ -CH <sub>2</sub> ); 2.65 (t, $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ); 3.80 (t, $\alpha$ -CH)                                                                                                                                                                                                                                                                     | x | x |
| 29 | m-ino | <i>mio</i> -Inositol                       | 3.286 (t, C <sub>5</sub> H); 3.544 (dd, C <sub>1</sub> 'H / C <sub>3</sub> H); 3.632 (t, C <sub>4</sub> H / C <sub>6</sub> H); 4.072 (t, C <sub>2</sub> H)                                                                                                                                                                                                                                                 | x |   |
| 30 | NAD+  | Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada | 4.230 (m, A <sub>5</sub> 'H); 4.357 (m, A <sub>4</sub> 'H); 4.383 (m, A <sub>4</sub> 'H / N <sub>5</sub> 'H); 4.411 (dd, N <sub>3</sub> 'H); 4.469 (m, A <sub>3</sub> 'H); 4.513 (m, N <sub>2</sub> 'H); 6.031 (d, N <sub>1</sub> 'H); 6.104 (d, A <sub>1</sub> 'H); 8.172 (s, A <sub>2</sub> H / N <sub>5</sub> H); 8.827 (d, N <sub>4</sub> H); 9.122 (d, N <sub>6</sub> H); 9.339 (s, N <sub>2</sub> H) | x |   |
| 31 |       | Piruvato                                   | 2.38 (s, $\beta$ -CH <sub>3</sub> )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |   | x |
| 32 | PyGlu | Pirolutamatato                             | 2.05 (m, $\beta$ -CH <sub>2</sub> ); 2.40 (m, $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ); 2.495 (m, $\beta'$ -CH <sub>2</sub> ); 4.17 (dd, $\alpha$ -CH)                                                                                                                                                                                                                                                                  | x | x |
| 33 | Suc   | Succinato                                  | 2.41 (s, CH <sub>2</sub> )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |   | x |
| 34 |       | Taurina                                    | 3.27 (t, S-CH <sub>2</sub> ); 3.43 (t, N-CH <sub>2</sub> )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | x |   |
| 35 | Thr   | Treonine                                   | 1.341 (d, $\gamma$ -CH <sub>3</sub> ); 3.950 (d, $\alpha$ -CH); 4.269 (m, $\beta$ -CH)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | x | x |
| 36 | Tyr   | Tirosina                                   | 3.07 (m, $\beta'$ -CH); 3.21 (m, $\beta$ -CH); 3.95 (m, $\alpha$ -CH); 6.91 (d, C <sub>3</sub> H / C <sub>5</sub> H, anel); 7.21 (d, C <sub>2</sub> H / C <sub>6</sub> H, anel)                                                                                                                                                                                                                            | x | x |
| 37 | UDP   | Uridina difosfato                          | 4.231 (m, C <sub>5</sub> 'H, ribose); 4.280 (m, C <sub>4</sub> 'H, ribose); 4.398 (t, C <sub>2</sub> 'H, ribose); 4.44 (t, C <sub>3</sub> 'H, ribose); 5.97 (s, C <sub>1</sub> 'H, ribose); 5.98 (d, C <sub>6</sub> H, anel); 7.995 (d, C <sub>5</sub> H, anel)                                                                                                                                            | x |   |
| 38 | UTP   | Uridina trifosfato                         | 4.26 (m, C <sub>5</sub> 'H, ribose); 4.295 (m, C <sub>4</sub> 'H, ribose); 4.416 (t, C <sub>2</sub> 'H, ribose); 4.45 (t, C <sub>3</sub> 'H, ribose); 5.98 (s, C <sub>1</sub> 'H, ribose); 5.995 (d, C <sub>6</sub> H, anel); 7.982 (d, C <sub>5</sub> H, anel)                                                                                                                                            | x |   |
| 39 |       | UDP-glicose                                | 5.54 (m)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | x |   |
| 40 |       | UDP-n-acetilglicosamina                    | 5.52 (m)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | x |   |
| 41 | Val   | Valina                                     | 1.027 (d, $\gamma$ -CH <sub>2</sub> ); 2.265 (m, $\beta$ -CH); 3.625 (d, $\alpha$ -CH)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | x | x |
| 42 | Trp   | Triptofano                                 | 3.31 (dd, $\beta$ -CH); 3.48 (dd, $\beta'$ -CH); 4.05 (dd, $\alpha$ -CH); 7.21 (t, C <sub>5</sub> H, ring); 7.29 (t, C <sub>6</sub> H, ring); 7.31 (s, C <sub>2</sub> H, ring); 7.55 (d, C <sub>7</sub> H, anel); 7.74 (d, C <sub>4</sub> H, anel)                                                                                                                                                         | x | x |

**Tabela S3.** Atribuição dos picos de ressonâncias de  $^1\text{H}$ -RMN dos extratos lipídicos de células de Schwann. Multiplicidade: s, simpleto; d, duplete; t, tripleto; q, quarteto; m, multipeto; dd, duplete de dupletos; dt, duplete de tripletos; td, tripleto de quarteto.

| No. | Sigla               | Composto                                              | $\delta$ $^1\text{H}$ em ppm (multiplicidade, atribuição)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|---------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | Cho                 | Colesterol                                            | 0.68 (s, $\text{CH}_3$ -18);<br>0.86/0.87 (2xd, $\text{CH}_3$ -26/ $\text{CH}_3$ -27);<br>0.91 (d, $\text{CH}_3$ -21);<br>1.01 (s, $\text{CH}_3$ -19);<br>1.05-1.19 (m, múltiplos prótons);<br>1.42-1.55 (m, múltiplos prótons);<br>1.78-1.88 (m, múltiplos prótons);<br>2.00 (m, múltiplos prótons);<br>2.26 (m, $\text{CH}_2$ -4);<br>3.48-3.57 (m, $\text{CH}$ -3);<br>5.35 (m, $\text{CH}$ -6) |
| 2   | Chol ester          | Colesterol esterificado                               | 1.02 (s, $\text{CH}_3$ -19);<br>1.57 (m, múltiplos prótons);<br>1.84 (m, $\text{CH}_2$ -2);<br>2.31 (m, $\text{CH}_2$ -4);<br>4.62 (m, $\text{CH}$ -3)                                                                                                                                                                                                                                             |
| 3   | DG                  | Diglicerídios                                         | 3.71, 4.27 (gliceril $\text{CH}_2$ sn1/sn3);<br>5.08 (gliceril $\text{CH}$ sn2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 4   |                     | Cadeias acila<br>(principalmente em<br>fosfolipídios) | 0.88 (t, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ );<br>1.25 (m, $(\text{CH}_2)_n$ );<br>1.55-1.65 (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CO}$ );<br>1.98-2.09 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$ );<br>2.25-2.35 (m, $-\text{CH}_2\text{COOR}$ );<br>2.77-2.87 (m, $=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{}$ );<br>5.35 (m, $-\text{HC}=\text{CH}-$ )                                                                    |
| 5   |                     | Ácidos graxos livres                                  | 0.97 (t, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ );<br>1.63 (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CO}$ );<br>2.05 (m, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$ );<br>2.35 (t, $-\text{CH}_2\text{COOH}$ );<br>2.77 (t, $=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{}$ )                                                                                                                                                                |
| 6   | PtC                 | Fosfatidilcolina                                      | 3.35 (s, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ );<br>3.82 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ );<br>3.99 (gliceril $\text{CH}_2$ sn3);<br>4.12, 4.38 (gliceril $\text{CH}_2$ sn1);<br>4.40 ( $\text{CH}_2\text{-OP}$ );<br>5.22 (gliceril $\text{CH}$ sn2)                                                                                                                                                                |
| 7   | PtE (diacil)        | Fosfatidiletanolamina<br>(diacil forma)               | 3.18 (s, $\text{CH}_2\text{-N}$ );<br>3.55 (gliceril $\text{CH}_2$ sn1);<br>3.92 (gliceril $\text{CH}_2$ sn3);<br>4.12 ( $\text{CH}_2\text{-OP}$ );<br>5.22 (gliceril $\text{CH}$ sn2)                                                                                                                                                                                                             |
| 8   | PtE<br>(plamogênio) | Fosfatidiletanolamina<br>(forma plasmosa)             | 1.27 ( $(\text{CH}_2)_n$ );<br>1.99 ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$ );<br>3.90 (gliceril $\text{CH}_2$ sn3);<br>4.34 (gliceril $\text{CH}_2$ sn1);<br>5.15 (gliceril $\text{CH}$ sn2);<br>5.91 ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ )                                                                                                                                                                    |
| 9   | SM                  | Esfingomielina                                        | 3.34 (s, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ );<br>5.45 ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ );<br>5.70 ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ )                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 10  | TG                  | Triglicerídeos                                        | 4.12, 4.28 (gliceril $\text{CH}_2$ sn1/sn3);<br>5.27 (gliceril $\text{CH}$ sn2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

### 3. CERTIFICADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



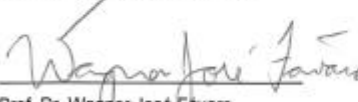
#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Preparo e caracterização de nanopartículas funcionais contendo articaína para aplicação em tecidos inflamados, registrada com o nº 4832-1/2018, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Enelda de Paula e Gustavo Henrique Rodrigues da Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 04 de junho de 2018.

|                                                  |                                                               |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Finalidade:                                      | ( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica                          |
| Vigência do projeto:                             | 01/07/2018-01/07/2020                                         |
| Vigência da autorização para manipulação animal: | 01/07/2018-01/07/2020                                         |
| Espécie / linhagem/ raça:                        | Rato heterogêneo / HanUnib: WH (Wistar)                       |
| No. de animais:                                  | 180                                                           |
| Idade/Peso:                                      | 05 semanas / 150g                                             |
| Sexo:                                            | machos                                                        |
| Origem:                                          | CEMIB/UNICAMP                                                 |
| Biotério onde serão mantidos os animais:         | Biotério LED, Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB/UNICAMP |

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 04 de junho de 2018.

  
Prof. Dr. Wagner José Favaro  
Coordenador

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação do relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada **Análise farmacocinética e de distribuição local no tecido-alvo de articaína encapsulada em sistemas carreadores baseados em lipídios**, registrada com o nº **5852-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Eneida de Paula e Gustavo Henrique Rodrigues da Silva**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **19/08/2021**.

|                                                         |                                                |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>Finalidade:</b>                                      | <b>( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica</b>    |
| <b>Vigência do projeto:</b>                             | 01/09/2021 a 31/07/2022                        |
| <b>Vigência da autorização para manipulação animal:</b> | 19/08/2021 a 31/07/2022                        |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)       |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 6                                              |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 5.00 Semanas / 150.00 Gramas                   |
| <b>Sexo:</b>                                            | 6 Machos                                       |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)       |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 6                                              |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 5.00 Semanas / 150.00 Gramas                   |
| <b>Sexo:</b>                                            | 6 Machos                                       |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)       |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 6                                              |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 5.00 Semanas / 150.00 Gramas                   |
| <b>Sexo:</b>                                            | 6 Machos                                       |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)       |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 6                                              |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 5.00 Semanas / 150.00 Gramas                   |
| <b>Sexo:</b>                                            | 6 Machos                                       |
| <b>Espécie / linhagem/ raça:</b>                        | Camundongo heterogênico / HanUnib: WH (Wistar) |
| <b>No. de animais:</b>                                  | 6                                              |
| <b>Idade/Peso:</b>                                      | 5.00 Semanas / 150.00 Gramas                   |
| <b>Sexo:</b>                                            | 6 Machos                                       |