



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

STEPHANY DI CARLA SANTOS

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE DOR E SEGURANÇA  
DECORRENTE DA APLICAÇÃO DE MICROAGULHAS NA CAVIDADE  
BUCAL DE VOLUNTÁRIOS SADIOS.

PIRACICABA

2019

STEPHANY DI CARLA SANTOS

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE DOR E SEGURANÇA  
DECORRENTE DA APLICAÇÃO DE MICROAGULHAS NA CAVIDADE  
BUCAL DE VOLUNTÁRIOS SADIOS.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Odontologia, na Área de Fisiologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Michelle Franz  
Montan Braga Leite

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Stephany Di Carla Santos e orientada pelo Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

PIRACICABA

2019

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2016/24057-0; FAPESP, SPRINT 2015/50004-5; FAPESP, 2012/06974-4  
**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1784-5045>

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

D547a Di Carla, Stephany, 1992-  
Avaliação da intensidade de dor e segurança decorrente da aplicação de microagulhas na cavidade bucal de voluntários sadios / Stephany Di Carla Santos. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Michelle Franz Montan Braga Leite.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Microagulhas. 2. Administração tópica. 3. Mucosa bucal. 4. Odontologia. I. Franz-Montan, Michelle, 1982-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Pain and safety of microneedle application in the oral cavity of human volunteers

**Palavras-chave em inglês:**

Microneedles  
Administration, topical  
Mouth mucosa  
Dentistry

**Área de concentração:** Fisiologia Oral

**Titulação:** Mestra em Odontologia

**Banca examinadora:**

Michelle Franz Montan Braga Leite [Orientador]  
Leonardo Rigoldi Bonjardim  
Paulo Henrique Ferreira Caria

**Data de defesa:** 25-03-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia

**Identificação e informações acadêmicas e profissionais da aluna:**

- Orcid: 0000-0003-1784-5045

- Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/8888889078186535>



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25 de Março de 2019, considerou a candidata STEPHANY DI CARLA SANTOS aprovada.

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MICHELLE FRANZ MONTAN BRAGA LEITE

PROF. DR. LEONARDO RIGOLDI BONJARDIM

PROF. DR. PAULO HENRIQUE FERREIRA CARIA

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Ana Helena Andreassi Santos e José Raimundo dos Santos, por todo amor incondicional, apoio, dedicação e por acreditar em mim e nos meus sonhos. Serei eternamente grata por tudo.

E ao meu filho, Vincenzo Di Carla Rulli, por ser minha fonte de força, inspiração e amor, sempre farei o meu melhor por você.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Marcelo Knobel.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP-UNICAMP, na pessoa de seu Chefe Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes.

Aos demais professores da Área de Fisiologia e Biofísica, Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes e Prof. Dr. Yuri Martins Costa.

À Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG) da FOP-UNICAMP, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPG-O) da FOP-UNICAMP, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos auxílios financeiros concedidos para realização deste trabalho (Auxílio JP FAPESP nº 2012/06974-4 e FAPESP-SPRINT nº 2015/50004-5) e pela bolsa de Mestrado concedida (FAPESP/CAPES nº 2016/24057-0).

Aos professores das bancas de qualificação primeira e segunda fase, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, Profa. Dra. Carolina Steiner Oliveira Alarcon, Prof. Dr. Yuri Martins Costa.

Ao professor colaborador desta pesquisa, que nos cedeu as microagulhas e permitiu que esse estudo fosse possível através da parceria pelo projeto SPRINT-FAPESP, Prof. Dr. Harvinder Singh Gill, do Laboratório de Imuno-Engenharia & Micro-Nano Medicina, Departamento de Engenharia Química da Texas Tech University, Lubbock, TX, EUA.

Ao ex-aluno de Doutorado Henrique Abdalla, do PPG-O, da Área de Fisiologia

Oral, que realizou manualmente a dobra das microagulhas de todos os *patches* utilizados neste estudo, a partir de metodologia aprendida durante o estágio de Doutorado Sanduíche (Bolsa PDSE/Capes) no ano de 2017.

Às minhas colegas, Nádia Cristina Favaro Moreira e Gabriela Gama Xavier Augusto que me auxiliaram durante todo este estudo, minha gratidão.

Aos técnicos dos laboratórios de Fisiologia e Farmacologia Fábio Padilha (Fabinho) e Eliane Melo (Ely) e pela bela amizade, conversas entusiasmadas, solicitude e orientações.

À Sra. Érica Alessandra Sinhoreti, à Sra. Ana Paula Carone e à Sra. Raquel Quintana Sachi e Leandro Viganó, membros da CPG da FOP-UNICAMP, e à Srta. Elisa dos Santos, secretária do PPG-O da FOP-UNICAMP pela cordialidade, solicitude e presteza de seus serviços.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A Deus, por nunca me faltar força e fé para lutar pelos meus sonhos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite, pela dedicação, paciência, compreensão e meu grande exemplo de professora, minha eterna gratidão por caminharmos juntas até este momento.

Ao meu noivo, Gabriel Giusti Rulli, por acreditar em mim e lutar junto comigo em todos os momentos em que precisei, sem você nada disso seria possível.

Aos meus irmãos Radael Andreassi Santos e Randal Ian Santos, bem como minhas cunhadas, Marina Faria Santos e Joyce Adami que sempre me ajudaram e muitas vezes me ouviram.

Aos meus companheiros de laboratório, Bruno, Klinger, Jaiza e Fabinho que estiveram comigo durante todo o desenvolvimento deste estudo, me auxiliando e muitas vezes um ombro amigo, muito obrigada.

As minhas amigas de graduação, Livia, Rosana, Laís, Tatiane e Maria Elisa, que sempre me apoiaram nas minhas decisões e me incentivaram a seguir este caminho.

As minhas amigas de infância, Natalie Rose Bourne e Karina Komada, que mesmo com a distância e com os anos, nossa amizade só cresceu e se fortaleceu, muito obrigada por tudo, não conseguiria sem vocês do meu lado em cada etapa, vocês são minhas irmãs.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e avaliar a viabilidade de um dispositivo de aplicação; bem como a intensidade de dor e segurança decorrente da aplicação de microagulhas (MA) em diversas regiões da cavidade bucal. Para isso, foi desenvolvido um dispositivo de aplicação composto de uma seringa de 5 mL e uma mola posicionada no seu interior. A compressão da mola no interior da seringa em 2 mm (n=10 dispositivos) foi realizada contra uma balança analítica (n=10) para avaliar o kg/F induzido pela deformação da mola em dois dias distintos a fim de confirmar se o dispositivo era capaz de induzir uma força de aplicação homogênea. Em seguida, voluntários receberam a aplicação de MA com o dispositivo nas seguintes regiões da cavidade bucal: gengiva inserida, processo alveolar palatino, mucosa jugal, dorso de língua e porção interna do lábio inferior. As 5 regiões foram coradas com o auxílio de uma solução de violeta genciana a fim de evidenciar as microperfurações criadas, e confirmar se a força padronizada foi capaz de perfurar as diferentes regiões. Em um estudo clínico cruzado, randomizado e duplo cego, 30 voluntários foram submetidos nas 5 regiões da cavidade bucal, à aplicação de um *patch* de MA, de uma agulha hipodérmica 30G (AG, controle positivo) e de um *patch* idêntico porém sem MA (FL, controle negativo) para avaliação da dor decorrente das aplicações. A segurança do uso dos tratamentos foi avaliada visualmente imediatamente após (0 h) e no dia seguinte (24 h) das aplicações para verificação da ocorrência de equimose, ulceração, vermelhidão, inchaço ou sangramento. Os resultados de dor foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) com dois critérios, seguida do teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5%. O dispositivo avaliado desenvolveu força constante de aplicação de aproximadamente 10 N, com coeficiente de variação de 6,96% e foi capaz de perfurar uniformemente todos os sítios da cavidade bucal. Em todos os sítios avaliados, a aplicação das MA promoveu menor dor quando comparado com a AG ( $p < 0,05$ ), porém, as MA promoveram maior dor quando comparado ao FL ( $p < 0,05$ ), exceto na língua, onde as MA não diferiram do FL ( $p > 0,05$ ). Em acréscimo, a AG promoveu maior dor quando comparado ao FL em todos os sítios avaliados ( $p < 0,001$ ). Não houve nenhum caso de equimose, ulceração, vermelhidão ou inchaço. As MA promoveram pontos de sangramento na gengiva inserida e no processo alveolar palatino imediatamente após a aplicação e a AG promoveu pontos de sangramento em todos os sítios avaliados. Não houve caso de sangramento 24 h após. Em conclusão, o dispositivo de aplicação desenvolvido permitiu o desenvolvimento de uma força de aplicação homogênea e capaz de perfurar os diferentes sítios da cavidade bucal de forma segura e pouco dolorosa, quando comparado com a agulha hipodérmica 30G, oferecendo uma forma promissora para melhorar a eficácia clínica

de formulações tópicas aplicadas na cavidade bucal.

**Palavras-chave:** Microagulhas; Administração tópica; Mucosa bucal; Odontologia

## ABSTRACT

The objective of the present study was to develop and evaluate the feasibility of an applicator device; as well as the intensity of pain and safety due to the application of microneedles (MN) in several regions of the oral cavity. For this, an applicator device was developed composed of a 5 mL syringe and a spring positioned inside. The compression of the spring inside the syringe in 2 mm (n = 10 devices) was performed against an analytical balance (n = 10) to evaluate the kg /F induced by spring deformation on two different days in order to confirm if the device was able to induce a homogeneous application force. Afterwards, the application of MN with the device was performed in the following regions of the oral cavity: gingiva, palatine alveolar process, buccal mucosa, dorsum of the tongue and inner portion of the lower lip. The regions were stained with a solution of gentian violet in order to show the microperforations created, and to confirm if the standardized force was able to perforate the different regions. In a randomized, double-blind, crossover study, 30 volunteers were submitted to topical application of a patch of MN, 30G hypodermic needle (NE, positive control) and an identical patch without MN (FL, negative control) for evaluation of pain arising from applications. The safety of the use of the treatments was evaluated visually immediately after (0 h) and the next day (24 h) of the applications to verify the occurrence of ecchymosis, ulceration, redness, swelling or bleeding. Pain scores were compared by means of analysis of variance (ANOVA) with two criteria, followed by the Tukey test. The level of significance was set at 5%. The evaluated device developed a constant force of application of approximately 10 N, with coefficient of variation of 6.96% and was able to perforate uniformly all the sites of the buccal cavity. In all the evaluated sites, the application of the MN promoted less pain when compared to the NE ( $p < 0.05$ ), but the MN promoted more pain when compared to the FL ( $p < 0.05$ ), except in the tongue, where the MN did not differ from the FL ( $p > 0.05$ ). In addition, NE promoted more pain when compared to FL in all evaluated sites ( $p < 0.001$ ). There were no cases of bruising, ulceration, redness, or swelling. The MN promoted points of bleeding in the gingiva and in the palatine alveolar process immediately after the application and the NE promoted bleeding in all evaluated sites. There was no case of bleeding in the next day. In conclusion, the developed applicator device allowed the development of a homogenous application force capable of perforating the different sites of the oral cavity in a safe and painless manner when compared to the 30G hypodermic needle, offering a promising way to improve the effectiveness of topical formulations applied to the oral cavity.

**Keywords:** Microneedles; Topical administration; Oral mucosa; Dentistry

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>50</b>
	<b>Apêndice 1 - Certificado de apresentação no IADR.</b> .....	<b>50</b>
	<b>Apêndice 2 - Certificado de apresentação no SBPqO 2017.</b> .....	<b>51</b>
	<b>Apêndice 3 - Certificado de apresentação no SBPqO 2018.</b> .....	<b>52</b>
	<b>Apêndice 4 - Certificado de apresentação no AAPS 2018.</b> .....	<b>53</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>54</b>
	<b>Anexo 1 - Certificado de aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.</b> .....	<b>54</b>
	<b>Anexo 2 - Registro no site <i>ClinicalTrial.gov</i></b> .....	<b>56</b>
	<b>Anexo 3 - Relatório de originalidade Turnirin</b> .....	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A via transmucosa na cavidade bucal é uma via promissora para aplicação tópica de diferentes grupos de fármacos, uma vez que apresenta acesso fácil à via sistêmica com rápido início de ação, ausência de eliminação pré-sistêmica, degradação gastrointestinal e hepático de primeira passagem além de facilidade de administração (Kulkarni et al., 2009; Hearnden et al., 2012).

Apesar da mucosa que reveste a cavidade bucal ser mais permeável que a pele, a administração tópica de medicamentos nesta região ainda é um desafio, como resultado da eficiência da barreira epitelial, além da dificuldade da manutenção da formulação no sítio de aplicação devido a ação contínua da saliva e dos movimentos durante a fala, mastigação e deglutição (Chinna Reddy et al., 2011; Hearnden et al., 2012).

Desta forma, uma via comum e muito usada para se obter efeitos locais na mucosa bucal são as vias injetáveis, que causam dor e desconforto aos pacientes tanto no momento de punção como de injeção das soluções. Essa via de administração faz com que o paciente evite muitos tratamentos por medo de agulha (Armfield & Milgrom, 2011; Bariya et al., 2012a).

Microagulhas tem sido avaliadas como um potencial sistema “drug delivery” transdérmico, pois são capazes de criar microcanais na pele que facilitam a penetração de diferentes fármacos, de maneira pouco invasiva e com mínimo desconforto quando comparado com agulha hipodérmica (Gill et al., 2008; Haq et al., 2009; Gupta et al., 2011).

O uso tópico de microagulhas em pele está associado à diversas vantagens como possibilidade de autoadministração, menor desconforto ao paciente, melhor para pacientes com fobia de agulhas, rentabilidade, facilidade na entrega de moléculas grandes, facilidade de administração, potencial aumento da eficácia local do fármaco, e boa tolerância sem promover edema ou eritema (Prausnitz et al., 2004; Bariya et al., 2012b; Takeuchi & Kim, 2018).

Porém entre os diversos estudos que avaliaram a aplicação de microagulhas na pele, não atingem um denominador comum, descrevendo um dispositivo de aplicação e a força padronizada através desse dispositivo a fim de uniformizar as aplicações. Além disso, não há muitos estudos na literatura utilizando microagulhas na cavidade bucal e o uso desse sistema em humanos ainda não foi realizado. Desta forma, a hipótese deste estudo foi que o uso de microagulhas promove menor dor do que a agulha hipodérmica quando aplicado através de um dispositivo de aplicação (força padronizada em 10N) em diferentes sítios da cavidade bucal, tornando um sistema promissor para melhorar a penetração de fármacos tópicos nessa região.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Mucosa Oral**

#### **2.1.1. Sensibilidade e percepção dolorosa**

A dor pode ser causada por um dano tecidual e é definida como uma experiência multifatorial, envolvendo também os componentes sensorial e emocional, pois fatores como genética, gênero, emoções e experiências interferem na modulação da dor (Castro Lopes, 2003; Sessle et al., 2008).

Todas as vias sensoriais, começam com um estímulo na forma de energia que atua em um receptor sensorial, este por sua vez, atua como um transdutor, capaz de converter o estímulo em um sinal intracelular ocasionando em uma mudança no potencial de membrana, que atingindo o limiar, são gerados potenciais de ação que são transmitidos de um neurônio sensorial primário para um neurônio sensorial secundário, e assim sucessivamente até chegar no Sistema Nervoso Central (SNC) (Silverthorn, 2017).

Os receptores responsáveis por receber o estímulo nociceptivos, são os nociceptores, que são neurônios com terminações nervosas livres capazes de responderem a diversos estímulos (mecânicos, químicos ou térmicos) com potencial de causar ou que causam um dano tecidual, produzindo um sinal de alerta para se obter respostas protetoras (Silverthorn, 2017). Os sinais aferentes dos nociceptores são levados ao SNC por dois tipos de fibras, a A $\delta$  que são responsáveis por transmitir rapidamente a dor aguda, localizada pois suas fibras são finas e mielinizadas, e as fibras C, responsáveis por transmitir a informação de uma dor lenta e difusa, pois são fibras finas não mielinizadas (Castro Lopes, 2003; Sessle et al., 2008; Silverthorn, 2017).

Na região da cabeça, o nervo responsável por transmitir a informação dolorosa ao SNC é nervo trigêmeo que apresenta função mista, exercendo função motora e sensitiva (Sessle et al., 2008; Graff-Radford et al., 2015).

Não há muitos estudos na literatura que avaliaram a sensibilidade de diferentes sítios na cavidade bucal e região perioral, porém Grushka e colaboradores (1987), avaliaram a sensibilidade das seguintes regiões: 2,5 cm à direita e à esquerda do nariz, lábio inferior (junção mucocutânea), ponta da língua, dorso da língua (3 cm a partir da ponta da língua), e as bordas da língua (esquerda e direita) através de filamentos de von Frey do tipo Semmes-Weinstein em 43 voluntários. Seus resultados sugerem que os locais mais sensíveis são as regiões próximas do nariz e a ponta da língua, e que o lábio inferior é mais sensível que qualquer as outras regiões avaliadas na língua, i.e., dorso e bordas laterais (Grushka et al., 1987).

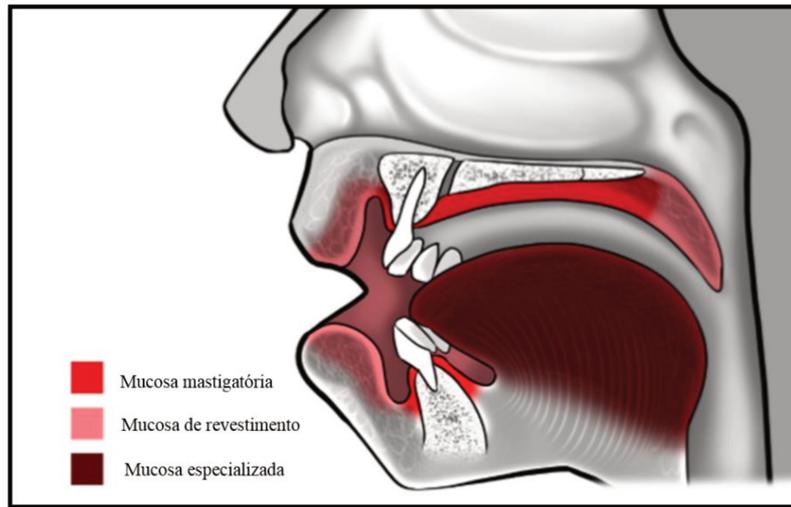
Komiyama e Laats (2005) avaliaram o limiar de detecção tátil e dolorosa, em 32

voluntários, sendo 16 homens e 16 mulheres. A avaliação foi realizada em múltiplos pontos de medição orofacial por meio de monofilamentos de von Frey do tipo Semmes-Weinstein e puderam concluir que na sensibilidade tátil a língua é o que apresenta menor limiar tanto para os homens como para as mulheres. Na avaliação dolorosa, houve uma diferença entre os gêneros, para as mulheres a região de maior sensibilidade dolorosa foi a ponta da língua e para os homens foi a gengiva, e a pele (bochecha e polegar) apresentaram os maiores limiares. (Komiya & De Laat, 2005).

Um outro estudo conduzido por Okayasu e colaboradores (2014) examinou a sensibilidade tátil e o limiar de dor na pele (bochecha, dorso e palma da mão e ponta dos dedos) e na ponta da língua, por meio de monofilamentos de von Frey do tipo Semmes-Weinstein com 20 diâmetros diferentes. Tanto para a sensibilidade tátil como para o limiar doloroso, a língua apresentou limiar mais baixo em comparação com as outras regiões avaliadas (seguido por bochecha, ponta do dedo, palma da mão e dorso da mão como maior limiar), mostrando uma maior sensibilidade tátil e dolorosa do que a pele (Okayasu et al., 2014).

### **2.1.2. Estrutura, organização e permeabilidade**

A cavidade bucal compreende a região interna dos lábios, gengiva, palato, assoalho da boca, parte interna das bochechas (mucosa jugal) e dorso da língua. Essas regiões apresentam diferenças na composição epitelial, originando diferentes tipos de mucosa, conforme ilustra a Figura 1. A *mucosa mastigatória* é revestida por um epitélio estratificado escamoso queratinizado e compõe as regiões de palato duro e gengiva inserida; a *mucosa de revestimento* é revestida por um epitélio estratificado escamoso não-queratinizado e compõe a (mucosa labial, assoalho bucal, gengiva livre, mucosa jugal e palato mole); a *mucosa especializada* que reveste exclusivamente o dorso da língua, é composta pelo epitélio estratificado escamoso contendo regiões de epitélio queratinizado e regiões não-queratinizadas, além da presença de papilas gustativas, que são responsáveis pela sensação de gosto dos alimentos (Franz-Montan et al., 2017a).



**Figura 1.** Ilustração esquemática da localização anatômica dos três tipos de mucosa que compõem a cavidade bucal. Figura adaptada de Franz-Montan et al. (2017a).

Imediatamente abaixo desses diferentes tipos de epitélio, encontra-se uma camada de tecido conjuntivo, chamada de lâmina própria. Sob a lâmina própria da mucosa não queratinizada, encontra-se a submucosa, composta por células adiposas frouxas, tecido glandular, vasos sanguíneos e nervos e, nas regiões de mucosa queratinizada e especializada, o epitélio e o tecido conjuntivo estão ligados diretamente ao perióstio e no músculo da língua, respectivamente (Squier & Brogden, 2011).

O mecanismo do transporte dos fármacos ocorre principalmente através de duas vias, a paracelular, entre as células e a transcelular, através das células, sendo que a via paracelular é a mais utilizada pelos princípios ativos e muitos fatores limitam a permeação das formulações (Hassan et al., 2010; Franz-Montan et al., 2017a). Mesmo a mucosa oral sendo mais permeável que a pele, a sua organização confere certa impermeabilidade, a qual apresenta um grande desafio para o desenvolvimento de fármacos capazes de atravessá-la de forma eficiente (Squier et al., 1991; Franz-Montan et al., 2017a).

Os queratinócitos constituem as principais células do epitélio que reveste a cavidade bucal. A união entre essas células através de desmossomos, forma uma barreira adicional de acesso ao tecido conjuntivo (lâmina própria) e é considerado um passo limitante para a absorção de fármacos. Além disso, a presença de queratina (estrato córneo), nas regiões de palato duro e gengiva inserida, também dificulta a penetração de princípios ativos (Hassan et al., 2010; Squier & Brogden, 2011; Franz-Montan et al., 2017a).

Em resumo, a permeabilidade da mucosa bucal é afetada pelas características do

epitélio, dependendo da sua estrutura (espessura e presença de queratinização) e a composição lipídica do material intercelular, o qual apresenta diferenças dependendo do tipo de mucosa (Squier & Hopps, 1976; Squier, 1984; Squier & Hall, 1984). Estudos demonstraram que a permeabilidade do epitélio da mucosa bucal é menor no palato e maior no assoalho bucal (Lesch et al., 1989; Harris & Robinson, 1992; Shojaei, [s.d.]).

Outro fator que pode limitar a penetração de ativos é a presença da saliva, pois apesar de exercer funções essenciais como a remineralização dos dentes, a saliva está constantemente lavando a cavidade bucal, diminuindo o contato e a biodisponibilidade de fármacos aplicados topicamente (Zylberberg & Matosevic, 2016). Outros fatores limitantes são os movimentos musculares para realização da mastigação, deglutição e fonação, que atrapalham a fixação da formulação farmacêutica no sítio de aplicação (Harris & Robinson, 1992; Chinna Reddy et al., 2011; Serpe et al., 2016).

Desta forma, diversas estratégias estão sendo desenvolvidas com a finalidade de se obter uma maior permeação de diferentes grupos de fármacos através da mucosa bucal tanto visando efeito sistêmico como efeito local.

## **2.2. Administração tópica na cavidade bucal**

Comercialmente, há diversos tipos de formulações farmacêuticas usadas para administração tópica de fármacos na cavidade bucal, como por exemplo géis, cremes, adesivos ou soluções (Franz-Montan et al., 2017a). Algumas características são essenciais para garantir a eficácia das formulações tópicas, como por exemplo, que apresente baixa toxicidade ou que não promova irritação no sítio de aplicação, com elevada capacidade mucoadesiva, garantindo fixação no local impedindo a sua remoção pela ação da saliva e dos movimentos orofaciais, além de possuir elevada capacidade de penetração tecidual (Zylberberg & Matosevic, 2016).

Portanto a fim de atingir esses objetivos e melhorar a ação terapêutica das formulações tópicas, são necessárias estratégias para melhorar as propriedades físico-químicas dos componentes das formulações (solubilidade, coeficiente de partição, compatibilidade com os outros constituintes da formulação, concentração, peso molecular, flexibilidade, pH, perfil reológico e biocompatibilidade) (Chinna Reddy et al., 2011).

Os sistemas de liberação controlada (“drug delivery systems”) surgiram como uma maneira de melhorar a capacidade das formulações tópicas com a finalidade de aumentar a permeação de ativos e agir de forma prolongada, aumentando a biodisponibilidade do fármaco no sítio de ação, se destacam os carreadores nanoestruturados como lipossomas, ciclodextrinas, nanopartículas poliméricas e lipídicas, como método químico de liberação controlada (Franz-

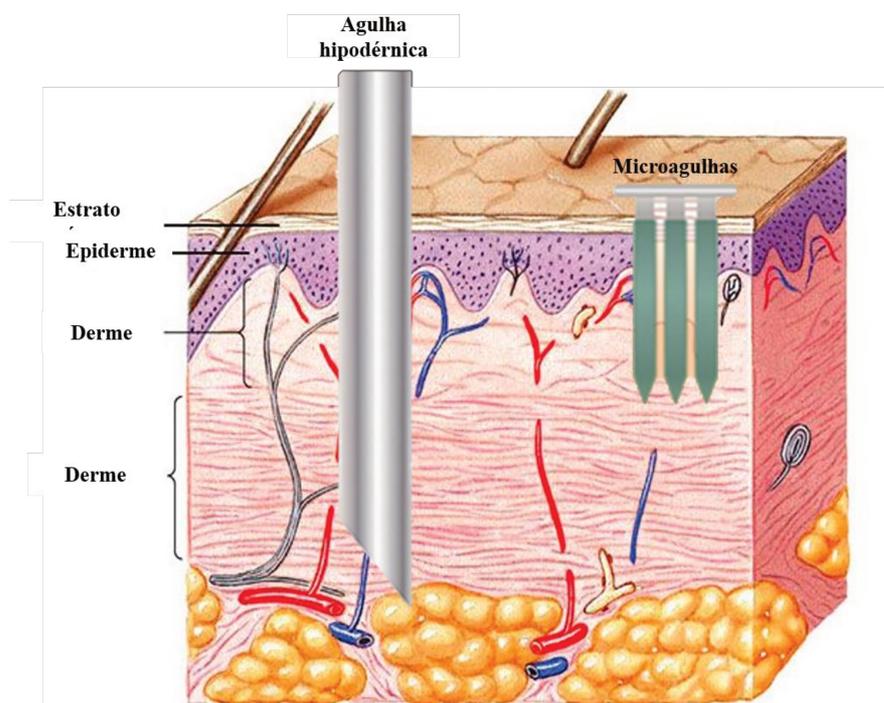
Montan et al., 2017b). Com esse mesmo objetivo, facilitar a penetração de ativos, surgem os métodos físicos que incluem iontoforese e microagulhas (Franz-Montan et al., 2017b).

A iontoforese é um método físico, capaz de aumentar a penetração de ativos através da mucosa envolvendo o uso de eletrodos que emitem uma corrente elétrica, que direcionam a penetração do ativo através do tecido em uma direção única, estabelecida pelo campo elétrico e pela carga do ativo (Wei et al., 2012).

Já as microagulhas, melhoram a absorção do ativo rompendo a barreira epitelial criando microporos pelos quais o fármaco penetra.

### 2.3. Microagulhas

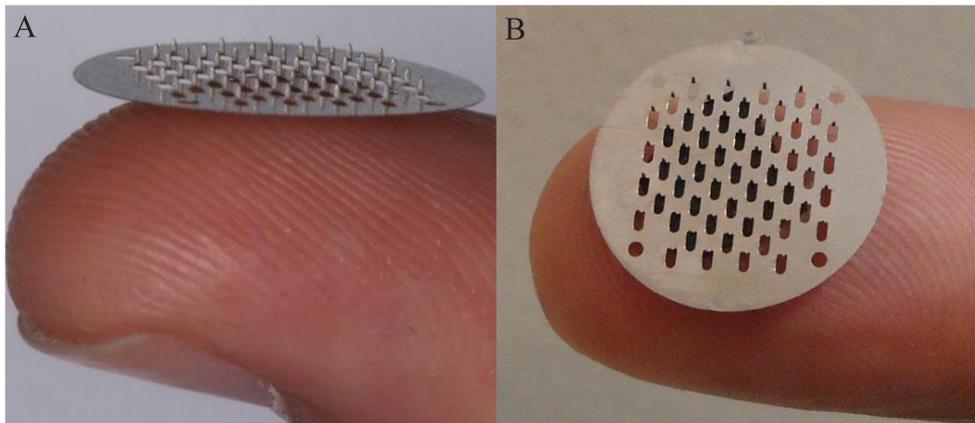
Microagulhas são microprojeções de no máximo 1500  $\mu\text{m}$  de comprimento, desenvolvidas para administração transdérmica de medicamentos (Gill & Prausnitz, 2007a; Gill et al., 2008). As microagulhas foram idealizadas para criar microperfurações no sítio de aplicação cutâneo a fim de romper a principal barreira à penetração de fármacos aplicados pela via tópica em pele, o estrato córneo, de maneira pouco invasiva, segura e pouco dolorosa (Gill et al., 2008). Essas características são possíveis pois as microagulhas são capazes de perfurar somente as camadas superficiais da pele, sem atingir as terminações nervosas localizadas nas regiões mais profundas, conforme ilustra a Figura 2.



**Figura 2.** Ilustração comparativa da perfuração da pele utilizando uma agulha hipodérmica (localizada à esquerda da imagem) e microagulhas (à direita da imagem). Figura adaptada de Prausnitz e colaboradores (2004). (Prausnitz et al., 2004).

Além disso, o uso tópico de microagulhas reúne diversas vantagens como segurança do método, boa aceitação do paciente pois reduz o medo associado às agulhas, rentabilidade, facilidade na entrega de moléculas grandes, facilidade de administração, potencial aumento da eficácia local do fármaco, e boa tolerância sem promover reações cutâneas locais como edema ou eritema (Prausnitz et al., 2004; Bariya et al., 2012b). Além dessas vantagens, as microagulhas podem ser autoadministradas pelo paciente, conferindo maior conveniência e, conseqüentemente, maior adesão ao tratamento (Takeuchi & Kim, 2018).

Normalmente, como mais de uma microagulha é utilizada, elas são organizadas de maneira agrupada (como em um *patch*, por exemplo), e podem ser fabricadas de diversos materiais como silicone, metal, aço inoxidável ou titânio (Ita, 2015). A Figura 3 ilustra uma imagem de um *patch* contendo 57 microagulhas de 750  $\mu\text{m}$  de comprimento, confeccionado em aço inox, semelhante ao utilizado no presente estudo. Nesse tipo de organização, normalmente as microagulhas são sólidas e são utilizadas para perfurar o local de aplicação de uma formulação previamente à sua aplicação tópica (Prausnitz, 2004).



**Figura 3.** Imagem de um *patch* de microagulhas de aço inox semelhante à utilizada no presente estudo, posicionada sobre o dedo indicador em (A) vista de cima e (B) vista lateral.

Outros tipos de microagulhas já foram descritos na literatura, as quais permitem a administração do fármaco simultaneamente à sua aplicação na pele. Dentre esses tipos destacam-se microagulhas revestidas com fármacos (Gill & Prausnitz, 2007a; Wermeling et al., 2008; Ma & Gill, 2014a; Ma et al., 2015), microagulhas com microcanal capaz de abrigar o medicamento no seu interior (Dharadhar et al., 2018), e aquelas à base de polímeros, onde o próprio polímero mais o medicamento compõem as microagulhas, que permanecem no sítio de aplicação, formando um depósito de liberação sustentada (Kochhar et al., 2013; Lee et al., 2017).

Diversos trabalhos *in vitro* e *in vivo* demonstraram significativa melhora na entrega transdérmica através do uso de microagulhas, sendo uma alternativa importante à administração do fármaco por via oral e injeções pelas vias intradérmica, subcutânea e intramuscular (Prausnitz et al., 2004; Gill & Prausnitz, 2007a; Dharadhar et al., 2018).

### **2.3.1. Percepção dolorosa decorrente da aplicação de microagulhas em pele**

Diversos estudos clínicos demonstraram que o uso de microagulhas na pele promove pouca dor ou desconforto em voluntários saudáveis. Gill e colaboradores (2008) concluíram que a aplicação tópica de microagulhas de aço inoxidável com diferentes comprimentos (480, 700, 960 e 1450  $\mu\text{m}$ ), angulações (20, 55 e 90 graus), número de microagulhas (1, 5 e 50 microagulhas), largura (160, 245 e 465  $\mu\text{m}$ ) e espessura (30, 45 e 100  $\mu\text{m}$ ) promoveu menor dor e desconforto quando comparado com agulha hipodérmica de 26G na região de antebraço de 10 voluntários. Ainda, os autores demonstraram que quanto menor o comprimento e o número de microagulhas, menor a percepção dolorosa (Gill et al., 2008).

Em um outro estudo, foi demonstrado que a aplicação de um *patch* contendo 16 microagulhas sólidas de aço inox de 200, 300 ou 400  $\mu\text{m}$  de comprimento com 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e de um *patch* com 16 microagulhas de aço inox de 300 ou 550  $\mu\text{m}$  de comprimento com 300  $\mu\text{m}$  de diâmetro, ocas contendo um microcanal interno, cortadas a partir de agulhas hipodérmicas de 30G obtidas comercialmente promoveram pouca dor e mínima irritação cutânea (que durou menos de 2 h) no antebraço de 18 voluntários saudáveis. Ainda, esses autores observaram que quanto maior o comprimento da microagulha, maior a duração de vermelhidão e do aumento do fluxo sanguíneo promovido. Em acréscimo, as microagulhas sólidas causaram uma maior irritação cutânea do que as ocas, porém, ambas causaram menor irritação cutânea do que a agulha hipodérmica (Bal et al., 2008).

De maneira semelhante, Haq e colaboradores (2009) demonstraram que *patches* contendo 36 microagulhas sólidas de 180 e 280  $\mu\text{m}$  de comprimento confeccionadas de platina, promoveu pouca dor e desconforto quando comparado com agulha hipodérmica de 25G simulando uma injeção hipodérmica na região das nádegas em 12 voluntários (Haq et al., 2009).

Outros autores, evidenciaram que o comprimento (500 e 750  $\mu\text{m}$ ), a espessura (75 e 124  $\mu\text{m}$ ), a largura (200 e 500  $\mu\text{m}$ ) e a quantidade de microagulhas no *patch* (10 e 50) não influenciaram na percepção de dor avaliada no antebraço de 10 voluntários e que o uso das diferentes geometrias de microagulhas, com exceção das microagulhas mais longas (1500  $\mu\text{m}$ ), promoveram dor semelhante a agulha hipodérmica 26G (Gupta et al., 2011).

Esses resultados são possíveis pois as microagulhas são suficientemente longas para

atravessar a principal barreira cutânea (estrato córneo) e facilitar a entrega de fármacos próximo dos capilares sanguíneos, entretanto, são curtas e incapazes de atingir os receptores da dor localizados na camada dérmica ( Gill & Prausnitz, 2007a; Bariya et al., 2012b).

### 2.3.2. Uso de microagulhas em mucosa bucal

Mais especificamente, a administração tópica de microagulhas na cavidade bucal tem sido pouco relatada na literatura. Alguns estudos buscaram estabelecer metodologias para realização de ensaios de permeação *in vitro* utilizando mucosa oral de suínos e microagulhas em células de difusão vertical do tipo Franz (Serpe et al., 2018, 2016).

O tratamento para câncer bucal envolve a administração injetável do agente quimioterápico no interior da lesão, porém além de causar dor aos pacientes, não distribui o fármaco de uma maneira eficiente. Um estudo concluiu que um *patch* de microagulhas de 700 de comprimento com 200 de largura, foram revestidas com doxorrubicina encapsuladas em nanopartículas e um *patch* de 57 microagulhas de 1 cm de comprimento e 1 cm de largura foram revestidas com doxorrubicina (sem nanopartículas), são capazes de promover uma distribuição uniforme e localizada do ativo no sítio de aplicação. Além disso, tecidos estavam sob uma almofada de papel e mostraram que com a aplicação das microagulhas não houve vazamento do fármaco através da mucosa, diferentemente da agulha hipodérmica que vazou 25% do fármaco injetado (Ma et al., 2015).

Em um estudo *in vivo* realizado em coelhos, foi demonstrado que microagulhas de 700  $\mu\text{m}$  de comprimento e 200  $\mu\text{m}$  de largura, organizadas em um *patch* contendo 5 microagulhas fabricadas de aço inoxidável revestidas com E2V3, uma vacina de partículas semelhantes a vírus HIV; e uma vacina de DNA do HIV gp160e, aplicadas topicamente na região interna do lábio inferior e no dorso da língua foram capazes de induzir respostas sistêmicas e imunes de forma semelhante à injeção intramuscular das vacinas. Ainda, a administração com microagulhas produziu resposta local nos sítios de aplicação, diferentemente da injeção intramuscular, que só produz uma resposta sistêmica (Ma & Gill, 2014b).

Desta forma, o uso de microagulhas é um sistema promissor para administração de medicamentos e vacinas pela via tópica em mucosa bucal, podendo ser muito útil no tratamento de lesões que dificilmente possuem tratamento tópico eficaz (Ma et al., 2014; Wang & Wang, 2015; Zhen et al., 2015; Creighton & Woodrow, 2018). Além disso, esse sistema pode melhorar a penetração de anestésicos locais e melhorar a eficácia de anestésicos tópicos nesta região. No entanto, a segurança e a avaliação da dor decorrente da aplicação desse sistema na mucosa bucal

de humanos ainda não foi avaliada na literatura.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Desenvolver e avaliar um dispositivo de aplicação para aplicação tópica de microagulhas com força padronizada e segura na cavidade bucal de humanos. Além disso, verificar a dor e a segurança da aplicação tópica de microagulhas sólidas de aço inoxidável, organizadas em um *patch* através do sistema desenvolvido em diferentes regiões da cavidade bucal, visando sua futura aplicabilidade como um sistema de liberação de fármacos para uso tópico em mucosa bucal.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Delineamento experimental**

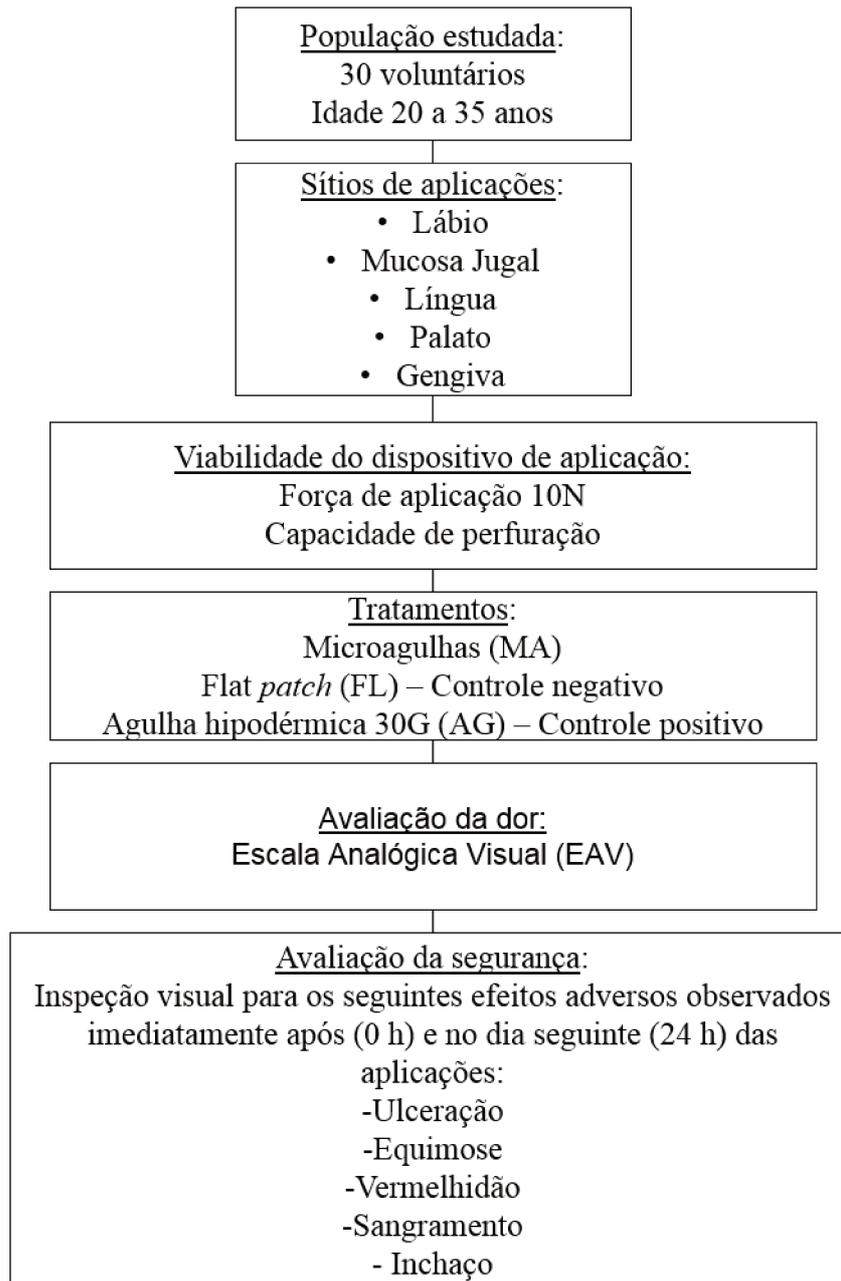
Primeiramente, a fim de padronizar a forma e força em que seriam feitas as aplicações com as microagulhas (MA) e com o controle negativo (FL), foi desenvolvido um dispositivo de aplicação que permitiu a padronização da força de aplicação em 10N. Então, foi confirmado que essa força de aplicação foi suficiente para perfurar os diferentes sítios da cavidade bucal, através da evidenciação dos microfuros com de violeta genciana 1%.

Em seguida, em um estudo clínico, cruzado, randomizado, duplo cego, controlado por placebo, realizado em duas sessões, 30 voluntários homens saudáveis receberam aplicação de microagulhas e dos dois controles (positivo e negativo) em diferentes regiões da cavidade bucal. O desconforto dos tratamentos foi avaliado através de uma escala analógica visual (EAV). A ocorrência de eventos adversos foi avaliada imediatamente após a realização dos tratamentos (0 h) e no dia seguinte (24 h).

A randomização deste estudo foi realizada por sorteio, utilizando-se o programa Microsoft® Excel. Foram randomizados o lado de aplicação (direito e esquerdo); a sequência de tratamentos (microagulhas, controle positivo e controle negativo); e a sequência dos sítios de aplicação (palato, língua, lábio, bochecha e gengiva). Os voluntários receberam os tratamentos nas regiões com intervalo de 30 segundos entre cada aplicação.

A aplicação dos tratamentos foi realizada por um dentista único e treinado, e a avaliação da percepção dolorosa dos procedimentos (aplicação da EAV) foi realizada por outro pesquisador, que desconhecia a ordem dos tratamentos realizados. O cegamento dos voluntários foi realizado através do uso de uma venda preta.

O delineamento experimental da fase clínica de avaliação do desconforto decorrente da aplicação das MA e dos controles nos diferentes sítios da cavidade bucal encontra-se resumida na Figura 4.



**Figura 4.** Fluxograma do delineamento experimental do estudo clínico de avaliação do desconforto decorrente da aplicação das MA e dos controles nos diferentes sítios da cavidade bucal.

#### 4.2. Considerações éticas

Os voluntários foram informados verbalmente do conteúdo da pesquisa, e após terem tomado ciência e aceito participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a resolução no 466/12, do Conselho Nacional de Saúde. Este estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (CAAE: 39194814.8.0000.5418) (Anexo I) e foi registrado no site ClinicalTrials.gov (Número Identificador: NCT03855397).

Os voluntários selecionados atenderam os seguintes critérios de inclusão: homens (mulheres foram excluídas pois o ciclo menstrual pode afetar a percepção da dor (Pieretti et al., 2016); com boa saúde geral, sem histórico de doenças sistêmica, neurológica ou psíquica; e boa saúde oral, sem sinal de doenças orais como cárie, gengivite, doença periodontal e presença de afta. Foram excluídos voluntários com hábitos frequentes de uso de álcool e fumantes; uso de aparelho ortodôntico fixo; voluntários que fizeram uso de medicamentos que alterassem a percepção de dor (analgésicos, anti-inflamatórios, antidepressivos), que receberam anestesia local ou que tiveram algum trauma na cavidade bucal nas últimas 2 semanas que antecederam o estudo.

#### 4.3. Fabricação do *patch* de microagulhas

As microagulhas utilizadas neste estudo foram preparadas de acordo com metodologia desenvolvida previamente pelo colaborador internacional dessa pesquisa (Gill & Prausnitz, 2007ab), o qual gentilmente doou os *patches* utilizados prontos para o uso. Brevemente, as microagulhas foram cortadas a partir de lâminas de aço de 75 µm de espessura (Trinity Brand Industries, SS 304; McMaster-Carr, Atlanta, GA, USA), usando um laser infravermelho (Resonetics Maestro, Nashua, NH, USA). Para a realização dos cortes da lâmina de aço, o desenho das microagulhas foi primeiramente feito em um software AutoCAD (Autodesk, Cupertino, CA, USA) e a partir deste desenho, o laser infravermelho foi ajustado em 1000 Hz, 20 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia, com 40% de atenuação para cortar as microagulhas. Um total de três passagens do laser foram realizadas para completar o corte na lâmina de aço. Foi utilizado a velocidade de 2 mm/s e um jato de ar com pressão constante de 140 Kpa. As microagulhas foram preparadas como linhas individuais de agulhas (agulhas “em plano”) e, subsequentemente, dobrados em 90° para fora do plano (agulhas “fora do plano”). A dobra das microagulhas foi realizada com uma lâmina de bisturi nº 9 com o auxílio de uma Lupa modelo SMZ-171-TLED Marca AREA Scientific.

As microagulhas recém cortadas pelo laser foram limpas manualmente com

detergente (Alconox, White Plains, NY, USA), para aplainar a superfície e remover os depósitos de óxido gerados durante o corte com laser, seguido de lavagem completa em água corrente. Após a lavagem das microagulhas, elas foram submetidas a um eletropolimento para remover as irregularidades, impurezas, bem como afiar as suas pontas. Para isso elas foram imersas em um recipiente de vidro de 300 mL a 70 °C contendo uma solução de glicerina, ácido ortofosfórico (85%) e água numa proporção de 6: 3: 1 (v/v) sob agitação magnética (150 rpm). Uma placa de cobre foi utilizada como o cátodo, enquanto microagulhas atuaram como o ânodo. O ânodo foi vibrado a uma frequência de 10 Hz durante todo o processo de eletropolimento, usando um dispositivo de vibração construído sob encomenda para ajudar a remover as bolhas de gás geradas na superfície anódica durante o processo. Uma densidade de corrente de 1,8 mA/mm<sup>2</sup> foi aplicada durante 15 minutos para o processo. Depois do eletropolimento, as microagulhas foram limpas por imersão alternada em água deionizada e ácido nítrico 25% por três vezes, durante 30 segundos cada. Após esta lavagem, as microagulhas foram lavadas novamente em água corrente aquecida, seguida de uma lavagem final em água corrente deionizada. Em seguida, as microagulhas foram secas com ar comprimido antes de serem armazenadas em recipientes hermeticamente fechados até posterior uso. A espessura e o comprimento final das microagulhas após o processo de eletropolimento foi de aproximadamente 50 e 750 µm, respectivamente.

#### **4.4. Dispositivo de aplicação**

Um dispositivo para a aplicação das microagulhas foi desenvolvido a fim de se uniformizar a força de aplicação nas diferentes regiões da cavidade bucal avaliadas.

##### **4.4.1. Design do dispositivo de aplicação das microagulhas**

Foi desenvolvido um dispositivo simples composto por uma seringa de 5mL (Descarpack®, lote: SLLAA0014) contendo uma mola de cabono de 2,3 cm em seu interior, cuja deformação foi utilizada para padronizar força de aplicação para todas as aplicações. O *patch* de microagulhas foi fixado na superfície do êmbolo da seringa. O dispositivo completo foi esterilizado em autoclave (121°C, 1 atm, 15 minutos) antes das aplicações na cavidade bucal.

##### **4.4.2. Estudo preliminar para determinação da força desenvolvida pelo dispositivo de aplicação das microagulhas**

A força induzida pela deformação da mola foi padronizada em 2 mm de deslocamento, representando 1 unidade da seringa. Em um estudo preliminar, 10 dispositivos diferentes foram testados 10 vezes cada contra uma balança analítica para avaliar o kg/F induzido por esta deformação em dois dias distintos (n=200).

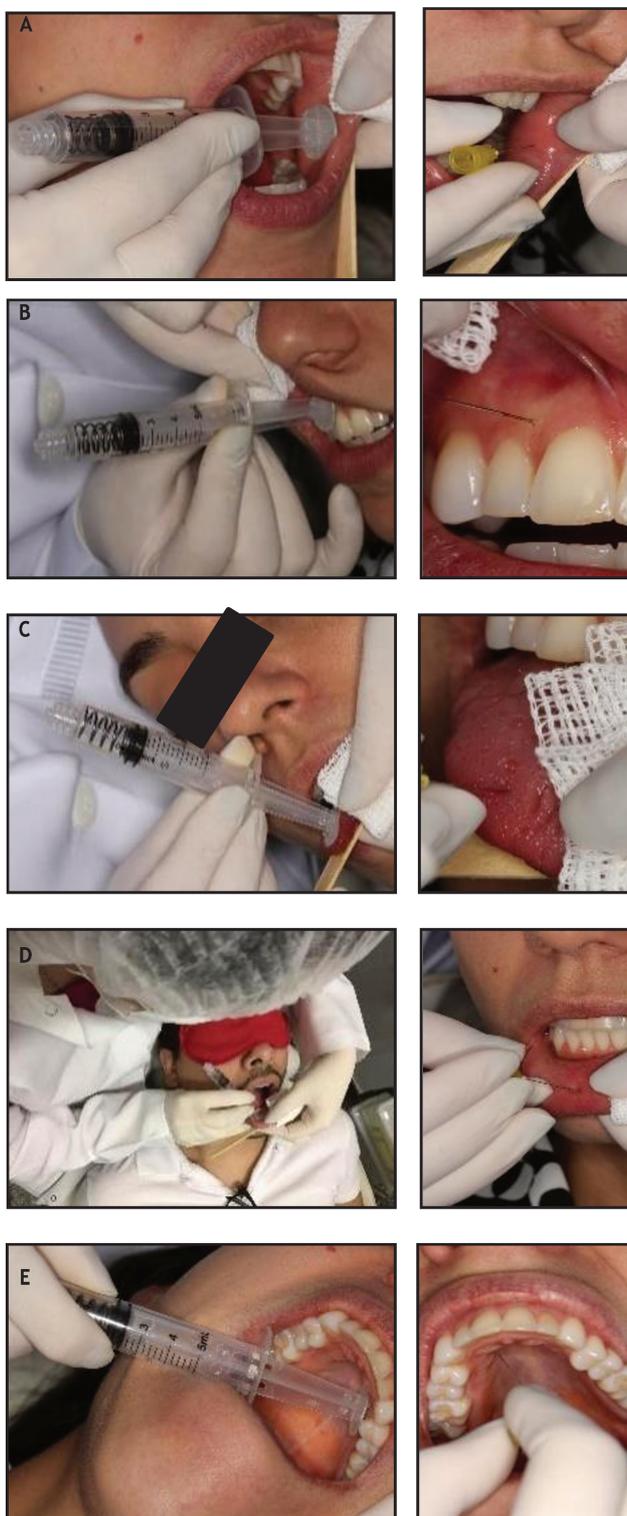
#### **4.4.3. Viabilidade do uso do dispositivo de aplicação das microagulhas em diferentes sítios da cavidade bucal**

A viabilidade do uso do dispositivo de aplicação desenvolvido foi verificada através da confirmação da perfuração promovida nos diferentes sítios avaliados. Brevemente, após a aplicação das microagulhas nos diferentes locais utilizando o dispositivo de aplicação desenvolvido, com a força padronizada nos experimentos anteriores, as regiões foram coradas com violeta de genciana a 1%, a fim de evidenciar os microcanais criados pelas microagulhas. As regiões coradas foram fotografadas.

#### **4.5. Tratamentos**

Uma agulha hipodérmica de calibre 30 G (agulha odontológica curta, Injex<sup>®</sup>, lote: 332/15) foi utilizada como controle positivo. Nas regiões de tecido mole (mucosa jugal, língua e lábio inferior), a agulha foi inserida na profundidade de 3 mm, padronizado com uma marcação à caneta. Nas regiões de tecido duro (palato e gengiva), as agulhas foram inseridas até contato com o periósteo. Um *patch* idêntico ao *patch* de microagulhas, confeccionado com o mesmo material, porém sem microagulhas, foi utilizado como controle negativo. Esse *patch* foi fixado no mesmo dispositivo desenvolvido para aplicação das microagulhas, a fim de se padronizar a mesma força de aplicação das microagulhas.

Os tratamentos foram realizados nas seguintes regiões da cavidade bucal: mucosa jugal (porção interna da bochecha, 1 cm atrás do ângulo bucal), gengiva inserida (entre os incisivos superiores centrais e laterais), língua (superfície dorsal da região anterior), lábio (parte interna do lábio inferior), e palato duro (processo alveolar da região anterior), conforme ilustra a Figura 5.



**Figura 5.** Fotos ilustrando a aplicação do *patch* através do dispositivo de aplicação desenvolvido (imagens da esquerda do painel) e do controle positivo (agulha hipodérmica, imagens da direita do painel) nos sítios: mucosa julgal (A), gengiva inserida (B), língua (C), lábio (D) e palato (E).

#### **4.6. Avaliação da dor**

Logo após cada aplicação (microagulhas, controles positivo e negativo) em cada um dos 5 locais, a dor decorrente do tratamento foi avaliada em uma Escala Analógica Visual (EAV) (Hjermstad et al., 2011). A EAV é formada por uma linha de 10 cm sem demarcações, contendo apenas os termos “sem dor”, no extremo esquerdo, e “dor insuportável” no extremo direito e as aplicações foram feitas pelo mesmo operador.

#### **4.7. Avaliação da segurança do uso de microagulhas nos diferentes sítios da cavidade bucal**

##### **4.7.1. Inspeção visual do local de aplicação das microagulhas**

A segurança da aplicação das microagulhas com o dispositivo de aplicação desenvolvido foi verificada imediatamente após a aplicação (0 h) e no dia seguinte (24 h) das aplicações. Os diferentes locais de aplicação foram inspecionados visualmente quanto a ocorrência de pontos de sangramento, ulceração, hematoma, vermelhidão ou inchaço. Além da inspeção visual, os locais foram fotografados aleatoriamente para fins de documentação.

##### **4.7.2. Avaliação da integridade das microagulhas após o uso**

A fim de confirmar a integridade das microagulhas após as inserções nas diferentes regiões da cavidade bucal, e assegurar a ausência de fratura do dispositivo no interior dos tecidos, todos os *patches* de microagulhas foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio modelo JEOL JSM 5600 PV, acoplado com Sistema de EDX, onde as amostras foram observadas com 15 kV e um aumento de 35, 40 e 50 x tanto em vista frontal como em vista lateral.

#### **4.8. Análise estatística**

Os resultados de intensidade de dor (em mm, avaliados através da EAV) estão apresentados em mediana e desvio interquartil. A distribuição normal foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e transformações do logarítmicas na base 10 foram aplicadas para as variáveis contínuas quando os resultados foram significativos, considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,050$ ).

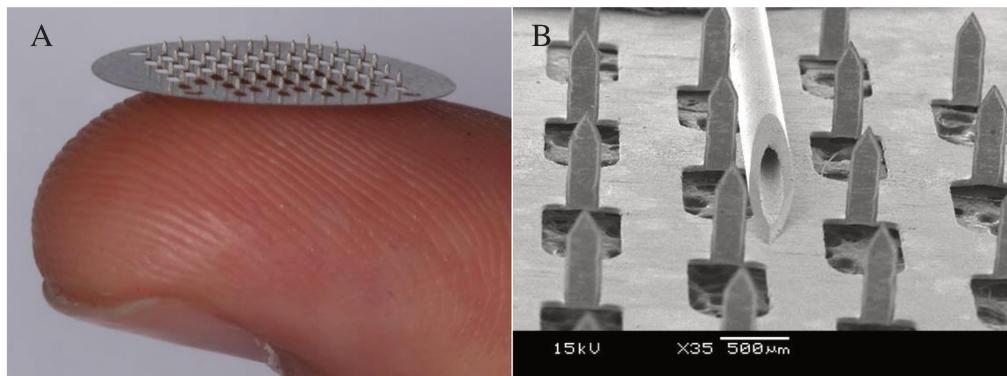
Uma análise de variância (ANOVA) com dois critérios foi calculada para avaliar as diferenças na intensidade da dor considerando os seguintes fatores intrasujeitos: local (cinco níveis - palato, língua, lábio inferior, mucosa e gengiva) e tipo de tratamento (três níveis - microagulha, *patch* e agulha hipodérmica). Já as análises para comparações múltiplas foram

realizadas usando o teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p = 0,050$ ).

## 5 RESULTADOS

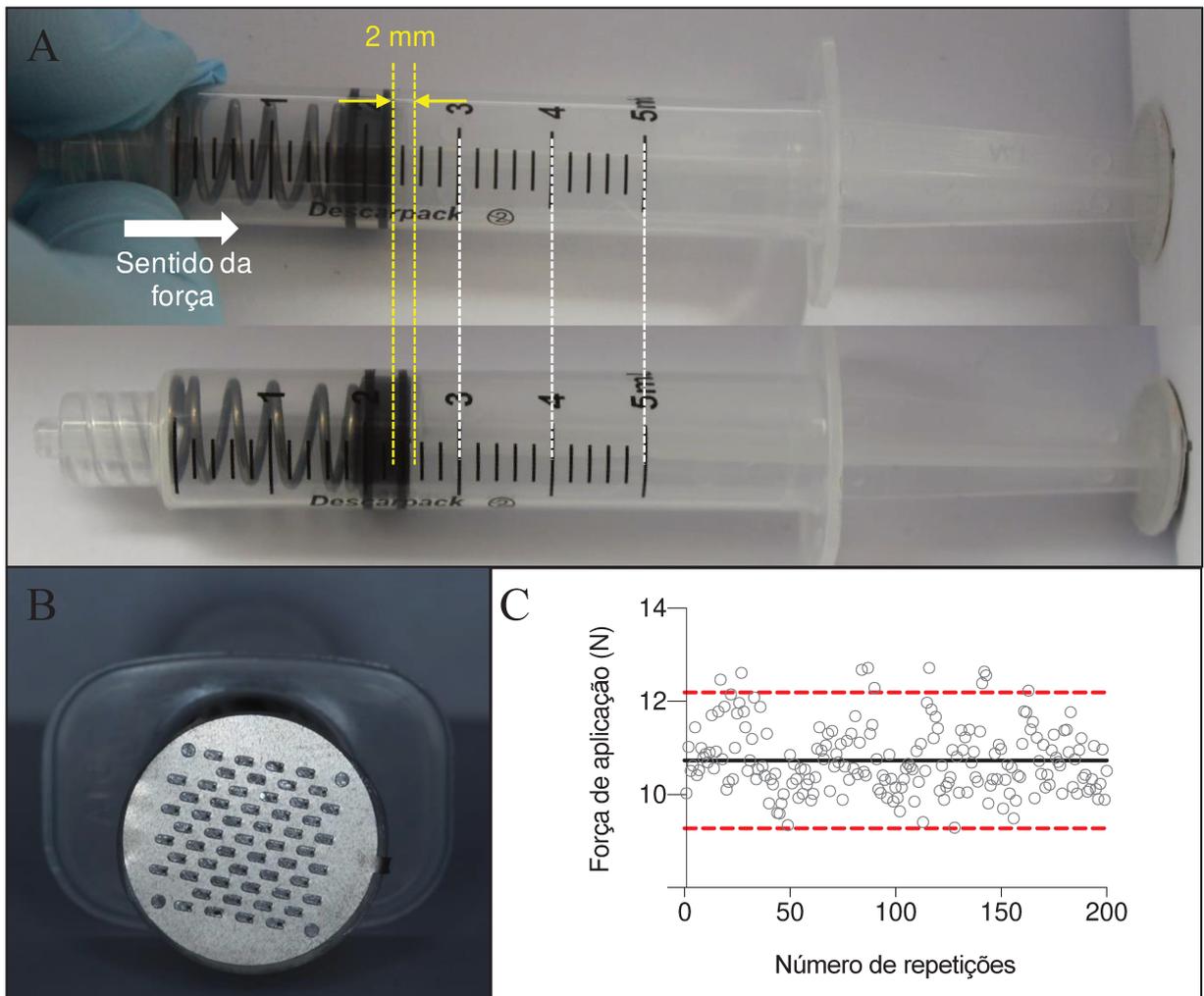
### 5.1. Validação e viabilidade do uso do dispositivo de aplicação desenvolvido

A Figura 6 (A) ilustra uma fotografia de um *patch* contendo 57 microagulhas de 750  $\mu\text{m}$  de comprimento, semelhante ao utilizado no presente estudo, posicionado sobre o dedo indicador humano, e (B) uma fotomicrografia obtida por de microscopia eletrônica de varredura de um *patch* de microagulhas não usado em comparação com uma agulha hipodérmica 30G utilizada neste estudo.



**Figura 6.** *Patch* contendo 57 microagulhas de 750  $\mu\text{m}$  de comprimento cada, posicionado sobre o dedo indicador humano (A). Fotomicrografia obtida por de microscopia eletrônica de varredura de um *patch* de microagulhas em comparação com uma agulha hipodérmica 30G (B).

A Figura 7A ilustra o dispositivo de aplicação desenvolvido para aplicação das microagulhas nas diferentes regiões da cavidade bucal. As linhas amarelas ilustram o sentido da deformação de 2 mm da mola. A Figura 7B mostra em detalhes a fixação do *patch* de microagulhas no êmbolo da seringa. A Figura 7C mostra a variação dos valores de força obtidos a partir de 10 dispositivos diferentes, realizadas em 2 dias distintos ( $n=200$ ). O coeficiente de variação dessas medidas foi de 6,96%, e foi considerado adequado para aplicação das microagulhas de maneira uniforme, a partir do qual o dispositivo desenvolveu uma força de aproximadamente 1 kg ( $\sim 10$  N).



**Figura 7.** Foto do dispositivo de aplicação desenvolvido para aplicação das microagulhas composto de uma seringa (5 mL) contendo uma mola no seu interior, ilustrando através de linhas amarelas o sentido da direção da força de aplicação (A). Detalhes da fixação do *patch* de microagulhas no êmbolo da seringa (B). Distribuição da força obtida (N) durante a avaliação do peso exercido pela deformação da mola a partir de 10 dispositivos diferentes, avaliados em dois dias distintos (n=200).

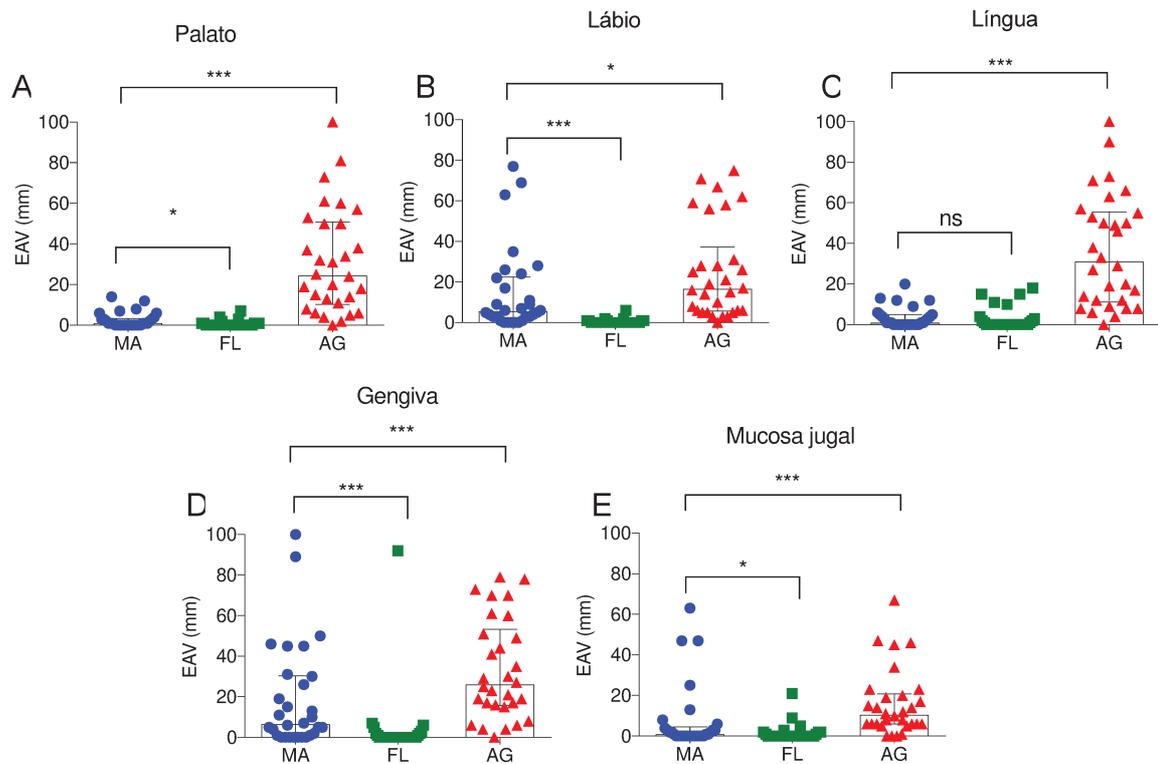
A Figura 8 apresenta as fotos dos sítios corados com violeta de genciana imediatamente após a aplicação do *patch* de microagulhas, demonstrando a pigmentação nos microfuros criados pelas microagulhas, confirmando que as microagulhas foram capazes de perfurar as diferentes regiões de mucosa queratinizada ou não da cavidade oral, utilizando o dispositivo de aplicação desenvolvido e a força padronizada em 10 N.



**Figura 8.** Fotos realizadas dos diferentes sítios de aplicação imediatamente após a evidenciação dos microfuros com violeta genciana 1% após a aplicação das microagulhas: palato (A); gengiva (B); e porção interna do lábio inferior (C).

## **5.2. Avaliação da dor e segurança da aplicação de microagulhas em diferentes sítios da cavidade bucal utilizando o dispositivo de aplicação desenvolvido**

A Figura 9 mostra os resultados da intensidade da percepção dolorosa decorrente dos diferentes tratamentos avaliados pelos voluntários nos diferentes sítios da cavidade bucal, através da Escala Analógica Visual (mm). Em todos os sítios avaliados, a aplicação das microagulhas promoveu menor dor quando comparado com o controle positivo ( $p < 0,05$ ). No entanto, as microagulhas promoveram maior dor quando comparado ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), exceto na língua, onde esses tratamentos não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ). Em todas as regiões, o controle positivo promoveu maior dor quando comparado ao controle negativo ( $p < 0,001$ ).



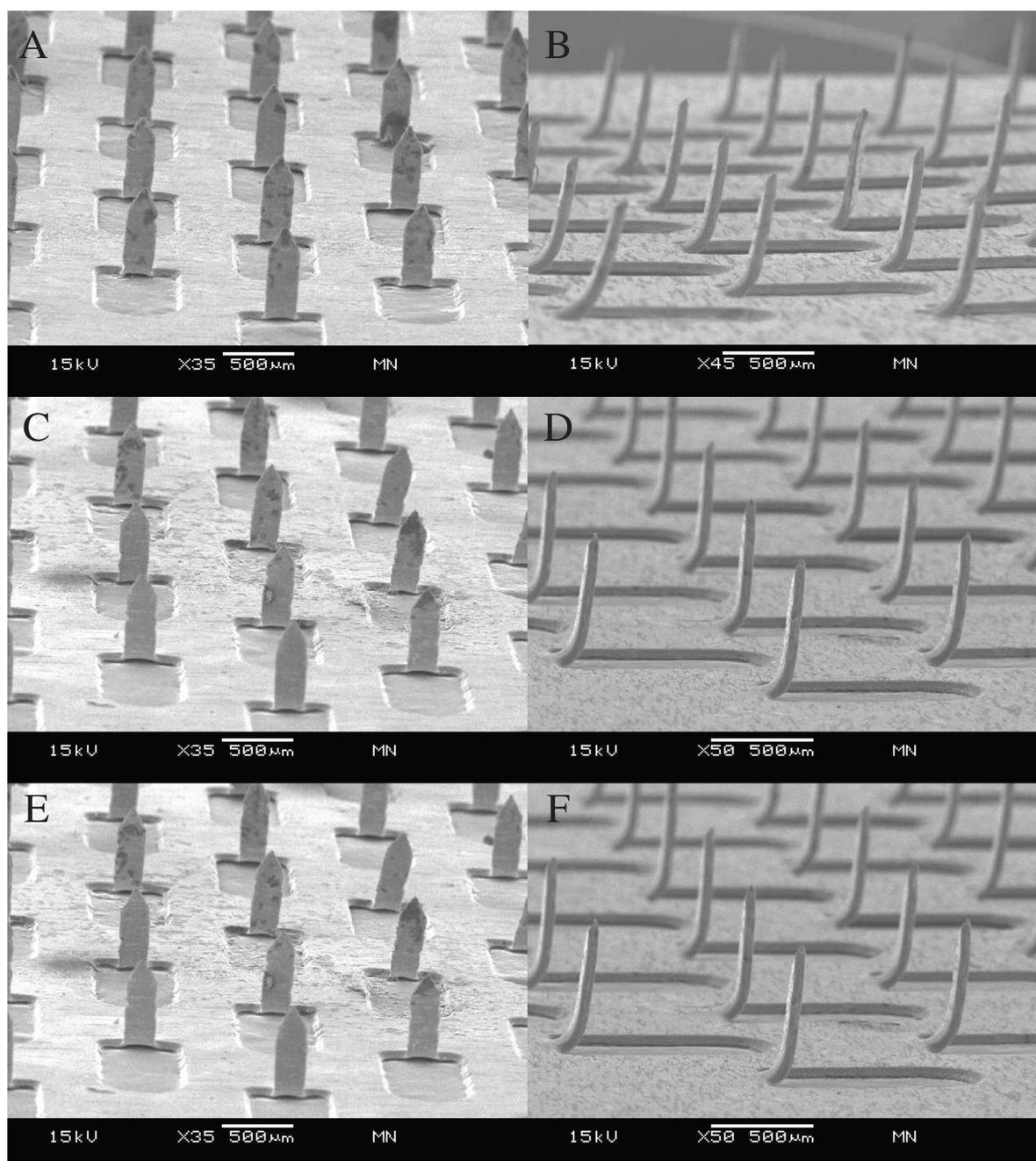
**Figura 9.** Mediana (desvio interquartílico) da percepção de dor avaliada através da EAV (em mm) decorrente da aplicação do *patch* de microagulhas (MA), controle negativo (FL) e controle positivo (agulha 30G) (AG) para os 5 sítios da cavidade oral: (A) palato; (B) lábio; (C) língua; (D) gengiva inserida; (E) mucosa jugal. Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (n=30).

A tabela 1 mostra a incidência de pontos de sangramento decorrente da aplicação dos tratamentos nas diferentes regiões da cavidade oral, imediatamente após as aplicações (0 h). Decorridos as 24 h, esses pontos de sangramento não foram mais observados. Não foram observados casos de vermelhidão, inchaço, equimose e ulceração após o uso dos tratamentos nos dois tempos analisados.

**Tabela 1.** Incidência de sangramento após a aplicação dos diferentes tratamentos (MA: microagulhas; FL: controle negativo; AG: controle positivo) nos diferentes sítios avaliados.

	MA	FL	AG
<b>Lábio</b>	0 (0%)	0 (0%)	2 (6,7%)
<b>Mucosa jugal</b>	0 (0%)	0 (0%)	4 (13,3%)
<b>Língua</b>	0 (0%)	0 (0%)	16 (53,3%)
<b>Palato</b>	3 (10%)	0 (0%)	11 (36,7%)
<b>Gengiva inserida</b>	4 (13,3%)	0 (0%)	13 (43,3%)

A Figura 10 apresenta as fotomicrografias dos *patches* de microagulhas após aplicação nos diferentes sítios da cavidade bucal avaliados, utilizando o dispositivo de aplicação desenvolvido com força de aproximadamente 10 N. Foi possível verificar que as microagulhas permaneciam anguladas após a inserção nos 3 diferentes tipos de mucosa de revestimento da cavidade bucal (queratinizada, não queratinizada e especializada). Além disso, essas fotomicrografias revelam a integridade das microagulhas após o uso, confirmando que não houve fratura de microagulhas no interior dos tecidos, demonstrando a segurança da aplicação dos *patches* utilizando o dispositivo de aplicação desenvolvido a partir da força padronizada.



**Figura 10.** Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microagulhas (MA) usadas nos voluntários. Imagens da esquerda mostram vista frontal e as imagens da direita, mostram vista lateral das MA. MA usadas em: mucosa jugal (A e B); gengiva inserida (C e D); dorso da língua (E e F).

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a viabilidade de aplicação de microagulhas em cavidade bucal de humanos, em um estudo cruzado, randomizado e controlado e foi possível confirmar a hipótese de que a aplicação tópica de microagulhas em diferentes regiões da mucosa bucal promove menor percepção dolorosa quando comparada com agulha hipodérmica. Esses resultados, corroboram com estudos clínicos realizados na pele de antebraço de voluntários sadios, no qual microagulhas de diferentes geometrias, promoveram menor percepção dolorosa quando comparada com a inserção de agulha hipodérmica (Gill et al., 2008; Gupta et al., 2011). O presente estudo também apresentou resultado semelhante ao relatado por Haq e colaboradores (2009), os quais demonstraram que a aplicação tópica de microagulhas induziu menor percepção dolorosa na pele das nádegas de voluntários quando comparado com agulha hipodérmica (Haq et al., 2009).

Nesses estudos clínicos, a agulha hipodérmica foi inserida na pele simulando uma injeção subcutânea ou com penetração de 5 mm (Gill et al., 2008; Haq et al., 2009). Já no presente estudo, essas inserções não foram viáveis considerando a anatomia das diferentes regiões da cavidade bucal e considerando que essa técnica não é comumente realizada dentro da boca. Desta forma, no presente estudo, a agulha penetrou 3 mm em mucosa de revestimento e nos casos de mucosa mastigatória, penetrou até o contato com perióstio. Apesar dessas diferenças na inserção da agulha hipodérmica realizada em pele e mucosa bucal, os resultados foram semelhantes e demonstraram que a inserção da agulha hipodérmica causa maior desconforto do que a aplicação tópica de microagulhas.

Em relação ao tamanho das microagulhas, nos estudos realizados em pele, os comprimentos avaliados foram bem variados e não excedeu 1495  $\mu\text{m}$ , o que pode justificar a menor percepção dolorosa induzida por esse sistema (Gill et al., 2008; Haq et al., 2009). No entanto, Gupta e colaboradores (2011), relataram que microagulhas mais longas (1500  $\mu\text{m}$ ) induziram uma percepção dolorosa igual quando comparadas com agulha hipodérmica 26G (Gupta et al., 2011).

Desta forma, nesse estudo optamos por avaliar um *patch* com microagulhas de 750  $\mu\text{m}$  de comprimento, o que seria um comprimento intermediário daqueles já testados em humanos (180-1500  $\mu\text{m}$ ). Além disso, considerando que, o tecido epitelial é a principal barreira de penetração de um fármaco aplicado topicamente na cavidade bucal, e os diferentes sítios avaliados apresentam uma ampla variação de espessura epitelial (cerca de 70  $\mu\text{m}$  na gengiva inserida, e a superiores a 500  $\mu\text{m}$  na mucosa jugal), optamos por avaliar uma microagulha que

tivesse comprimento mínimo e suficiente para atravessar os diferentes sítios de aplicação (Squier & Brogden, 2011; Prestin et al., 2012; Alves et al., 2018).

Em relação à agulha hipodérmica utilizada no presente estudo, diferentemente dos estudos em pele que relatam uso de calibre 26G, utilizamos uma agulha de calibre menor (30G), uma vez que é o calibre de agulha odontológica curta mais utilizada durante injeções infiltrativas na cavidade bucal (Reed et al., 2012)

Cabe ressaltar que, apesar das microagulhas promoverem menor desconforto quando comparado ao controle positivo, as microagulhas induziram maior dor e desconforto quando comparado ao controle negativo, na maioria dos sítios da cavidade bucal avaliados (exceto a língua), corroborando os resultados descritos por Gill e colaboradores (2008) realizado em pele de antebraço (Gill et al., 2008). Nesse estudo, apesar do controle negativo utilizado (i.e. haste de teflon de ponta romba de 3 mm de diâmetro) diferir do presente estudo (*patch* idêntico porém sem microagulhas) os resultados foram semelhantes. Outros estudos clínicos que avaliaram percepção dolorosa de microagulhas em pele, não relataram o uso de controle negativo (Haq et al., 2009; Gupta et al., 2011).

Por outro lado, Bal e colaboradores (2008) demonstraram que o uso de microagulhas com comprimentos variáveis (200 a 550  $\mu\text{m}$ ) promoveu menor percepção dolorosa quando comparado ao controle negativo. O controle negativo relatado por esses autores é um molde idêntico, porém sem microagulhas, semelhante ao controle negativo usado no presente estudo. Essa diferença pode ser explicada uma vez que os autores não descreveram qual foi a força de aplicação das microagulhas, e se essa força foi padronizada foi a mesma utilizada para aplicação do controle negativo (Bal et al., 2008). No presente estudo, tanto o *patch* de microagulhas quanto o *patch* controle negativo foram aplicados com a mesma força, padronizada pelo uso do dispositivo de aplicação desenvolvido.

A língua, embora apresente uma alta densidade de inervação somatossensorial, mostrou a mesma intensidade de dor quando comparados o controle negativo e as microagulhas. Isso poderia ser explicado pelo aporte somatossensorial tátil concomitante ao estímulo nociceptivo das microagulhas, i.e., houve uma necessidade de manipulação prévia por meio de uma espátula de madeira como apoio e necessidade de contração da musculatura. Sendo assim, é possível que este estímulo tátil possa ter modulado a barragem de impulsos nociceptivos, diminuindo a percepção dolorosa (inibição segmental). Essa relação fisiológica entre estímulos táteis e nociceptivos é historicamente conhecida como teoria do portão da dor e, evidências recentes têm sugerido que estímulos nociceptivos também podem modular a

percepção tátil (Costa et al., 2017).

A ponta da língua apresenta maior sensibilidade tátil e dolorosa quando comparas à outras regiões como gengiva e pele (bochecha, mão e dedo) (Okayasu et al., 2014; Komiyama & De Laat, 2005). Ainda, Grushka e colaboradores (1987) reportaram que ponta da língua e a área perinasal são os sítios mais sensíveis quando comparados ao lábio inferior, dorso da língua (3 cm a partir da ponta) e bordas linguais (Grushka et al., 1987). Porém, no caso do nosso estudo, as aplicações dos tratamentos foram realizadas no terço médio no dorso da língua. Sendo assim, o fato do estímulo não ter sido aplicado na região da ponta da língua associado à uma possível modulação pelos estímulos táteis durante a aplicação possam explicar a baixa sensibilidade dolorosa após aplicação de microagulhas.

O presente estudo também merece destaque por descrever pela primeira vez, o desenvolvimento de um dispositivo de aplicação para microagulhas, capaz de padronizar a força de aplicação e diminuir o viés de uma administração mal padronizada. Essa preocupação foi escassamente descrita na literatura, onde poucos autores descrevem a força de aplicação de microagulhas ou como essa força foi padronizada em estudos clínicos. No presente estudo, o dispositivo de aplicação desenvolvido permitiu uma administração de microagulhas com aproximadamente 10 N de força igualmente em todos os sítios de aplicação. De maneira semelhante, Lee e colaboradores (2017) descreveram uma força padronizada de 12 N para aplicação de microagulhas confeccionadas à base de carboximetilcelulose e gelatina que se dissolvem no interior da pele. No entanto, esses autores não detalharam como essa força foi predeterminada e padronizada (Lee et al., 2017).

Outros autores desenvolveram um dispositivo de aplicação para um *patch* contendo 36 microagulhas sólidas de platina de 180 e 280  $\mu\text{m}$  utilizando seringa de 2 mL, semelhante ao utilizado no presente estudo. Esses autores também buscavam realizar aplicações com força padronizada, porém não descreveram qual foi a força de aplicação desenvolvida pelo dispositivo (Haq et al., 2009).

Cheung e colaboradores (2014) demonstraram em um estudo *in vitro* o desenvolvimento de um dispositivo de aplicação pneumático, utilizando ar comprimido, onde a força do pistão era predeterminada por uma válvula. Esses autores avaliaram diferentes forças de aplicação (17,3; 34,6; 51,8; 60,5; e 69,1 N) para *patches* com 43 microagulhas de 1100  $\mu\text{m}$  de comprimento ou 31 microagulhas de 1400  $\mu\text{m}$  de comprimento e concluíram que somente forças de superiores à 51 N foi eficiente em promover a permeação passiva da insulina, uma vez que forças menores não estavam sendo capazes de perfurar de maneira eficiente a pele de

suínos, e as microagulhas se dobravam durante a aplicação (Cheung et al., 2014). Apesar desses autores relatarem uma força de aplicação superior à utilizada no presente estudo, trata-se de um sítio de aplicação com maior espessura epitelial e menor permeabilidade, envolvendo a permeação de um princípio ativo.(Shojaei, 1998).

Por outro lado, Davis e colaboradores (2004) demonstraram que a aplicação de microagulhas metálicas de 720  $\mu\text{m}$  com forças menores (0,1 a 3 N) seria capaz de perfurar a pele do dorso da mão com segurança, considerando que forças maiores poderiam fraturar a agulha no interior do sítio de aplicação. Ainda, eles concluíram que forças necessárias para fraturar microagulhas no momento de aplicação dependem da geometria e características das microagulhas (Davis et al., 2004). No presente estudo, apesar de usarmos uma força 3x maior, não houve nenhum caso de fratura, confirmado por análise das fotomicrografias obtidas das microagulhas usadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 10).

De maneira semelhante, outros autores, demonstraram através de análise de fotomicrografias obtidas por MEV que *patches* de 36 microagulhas de platina de 180 e 280  $\mu\text{m}$  de comprimento não foram danificadas nem fraturadas após a aplicação em região de antebraço de voluntários (Haq et al., 2009). Porém, os autores não relataram qual foi a força de aplicação e como a aplicação foi padronizada.

Além de termos demonstrado a segurança do dispositivo de aplicação com a força padronizada, também demonstramos que ela foi suficiente para perfurar os diferentes sítios da cavidade bucal (Figura 5). Essa confirmação foi realizada através da evidênciação das perfurações com violeta genciana 1%, conforme demonstra a Figura 8. Outros autores também evidenciaram microp perfurações produzidas pela aplicação tópica das microagulhas em pele utilizando outros corantes como azul de metileno por exemplo (Gill et al., 2008; Haq et al., 2009). Optamos pela escolha da violeta de genciana uma vez que este é um agente antifúngico muito utilizado no tratamento de infecções por *Candida* na região orofaríngea (Pienaar et al., 2010).

Além da confirmação de ausência de fraturas e danos das microagulhas usadas, no presente estudo verificamos que a aplicação tópica das microagulhas nos diferentes sítios da cavidade bucal de voluntários não promoveu efeitos colaterais como ulceração, equimose, vermelhidão ou inchaço, demonstrando a segurança da aplicação desse sistema a partir do dispositivo desenvolvido. De maneira semelhante, Bal e colaboradores (2008) demonstraram que diferentes tipos de microagulhas (ocas ou sólidas) com comprimentos variáveis (200-550) promoveram mínimo grau de irritação cutânea, avaliada através da avaliação da vermelhidão cutânea e avaliação do fluxo sanguíneo local, a qual teve duração máxima de 2 h decorrida da

aplicação das microagulhas (Bal et al., 2008).

No entanto, no presente estudo, alguns pontos de sangramento foram observados nas regiões de palato duro e gengiva inserida decorrente do uso das microagulhas, enquanto que a agulha hipodérmica promoveu pontos de sangramento em todas as regiões avaliadas. Nas regiões que ocorreram pontos de sangramento com o uso das microagulhas (palato e gengiva), o tecido epitelial é mais fino que os demais sítios avaliados, o que poderia justificar uma maior probabilidade das microagulhas atingirem a lâmina própria, região rica em vasos sanguíneos, justificando assim, a ocorrência de pontos de sangramento ocorrido (Squier & Brogden, 2011). Resultados semelhantes foram relatados por Ma e colaboradores (2014), os quais relataram maior índice de sangramento em mucosa bucal de coelhos (região interna de lábio e língua) após o uso de agulha hipodérmica quando comparado com microagulhas, demonstrando que, independentemente dos sítios avaliados, as agulhas hipodérmicas causaram maior sangramento do que as microagulhas (Ma et al., 2014).

Considerando que já foi demonstrado em um estudo *in vivo* realizado no lábio e no dorso de língua de coelhos que o uso de microagulhas revestidas com vacinas para dois antígenos de HIV foi capaz de produzir a mesma resposta imune que a vacina administrada pela via intramuscular (Ma et al., 2014). E que no presente estudo, a percepção dolorosa decorrente da aplicação tópica de microagulhas foi semelhante ao controle negativo na mesma região, consideramos que este é o sítio mais promissor e indolor para administração de fármacos objetivando uma ação sistêmica.

Além disso, os outros sítios de aplicação na cavidade bucal podem ser sítios de aplicação igualmente promissores por terem apresentado uma sensibilidade reduzida, quando comparado com agulha hipodérmica, conforme já descrito anteriormente em outros estudos clínicos em pele (Gill et al., 2008; Haq et al., 2009; Gupta et al., 2011). É importante ressaltar que, uma outra vantagem da administração através de microagulhas é que, além do efeito sistêmico semelhante à via intramuscular, as microagulhas possibilitam uma efeito local relevante, conforme demonstrado por Ma e colaboradores (2014) o que torna este método de *drug delivery* promissor para ativos com ação local desejável (Ma et al., 2014).

## 7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o dispositivo de aplicação desenvolvido permitiu o desenvolvimento de uma força de aplicação homogênea de 10 N tanto para as microagulhas como para o controle negativo e que foi capaz de perfurar os diferentes sítios da cavidade bucal. As microagulhas sólidas de aço inox de 750  $\mu\text{m}$  demonstraram ser um sistema seguro e pouco doloroso quando comparado com a agulha hipodérmica 30G, oferecendo uma forma promissora para melhorar a eficácia clínica de formulações tópicas aplicadas na cavidade bucal objetivando tanto efeito local, quanto o efeito sistêmico.

## REFERÊNCIAS\*

- Alves PHM, Alves TCLP, Pegoraro TA, Costa YM, Bonfante EA, & de Almeida ALPF. Measurement properties of gingival biotype evaluation methods. *Clin Implant Dent Relat Res* 2018;20:280–4. doi:10.1111/cid.12583.
- Armfield JM, & Milgrom P. A clinician guide to patients afraid of dental injections and numbness. *SAAD Dig* 2011;27:33–9.
- Bal SM, Caussin J, Pavel S, & Bouwstra JA. In vivo assessment of safety of microneedle arrays in human skin. *Eur J Pharm Sci* 2008;35:193–202. doi:10.1016/j.ejps.2008.06.016.
- Bariya SH, Gohel MC, Mehta TA, & Sharma OP. Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system. *J Pharm Pharmacol* 2012a;64:11–29. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01369.x.
- Bariya SH, Gohel MC, Mehta TA, & Sharma OP. Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system. *J Pharm Pharmacol* 2012b;64:11–29. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01369.x.
- Castro Lopes JM. *Fisiopatologia da dor*. 1º ed. Lisboa: Permanyer Portugal; 2003.
- Cheung K, Han T, & Das DB. Effect of Force of Microneedle Insertion on the Permeability of Insulin in Skin. *J Diabetes Sci Technol* 2014;8:444–52. doi:10.1177/1932296813519720.
- Chinna Reddy P, Chaitanya KSC, & Madhusudan Rao Y. A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: current status of formulation and evaluation methods. *Daru* 2011;19:385–403.
- Costa YM, Castrillon EE, Bonjardim LR, Rodrigues Conti PC, Baad-Hansen L, & Svensson P. Effects of Experimental Pain and Lidocaine on Mechanical Somatosensory Profile and Face Perception. *J oral facial pain headache* 2017;31:115–23. doi:10.11607/ofph.1758.
- Creighton RL, & Woodrow KA. Microneedle-Mediated Vaccine Delivery to the Oral Mucosa. *Adv Healthc Mater* 2018;1801180:1–17. doi:10.1002/adhm.201801180.

---

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

Davis SP, Landis BJ, Adams ZH, Allen MG, & Prausnitz MR. Insertion of microneedles into skin: Measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *J Biomech* 2004;37:1155–63. doi:10.1016/j.jbiomech.2003.12.010.

Dharadhar S, Majumdar A, Dhoble S, & Patravale V. Microneedles for transdermal drug delivery: a systematic review. *Drug Dev Ind Pharm* 2018:1–14. doi:10.1080/03639045.2018.1539497.

Franz-Montan M, de Araújo DR, Ribeiro LN de M, de Melo NFS, & de Paula E. Nanostructured systems for transbuccal drug delivery. 1<sup>o</sup> ed. Elsevier Inc.; 2017a.

Franz-Montan M, Ribeiro LN de M, Volpato MC, Cereda CMS, Groppo FC, Tofoli GR, et al. Recent advances and perspectives in topical oral anesthesia. *Expert Opin Drug Deliv* 2017b;14:673–84. doi:10.1080/17425247.2016.1227784.

Gill HS, Denson DD, Burris B a, & Prausnitz MR. Effect of microneedle design on pain in human subjects. *Clin J Pain* 2008;24:585–94. doi:10.1097/AJP.0b013e31816778f9.

Gill HS, & Prausnitz MR. Does needle size matter? *J Diabetes Sci Technol* 2007a;1:725–9. doi:10.1177/193229680700100517.

Gill HS, & Prausnitz MR. Coated microneedles for transdermal delivery. *J Control Release* 2007b;117:227–37. doi:10.1016/j.jconrel.2006.10.017.

Graff-Radford S, Gordon R, Ganai J, & Tetradis S. Trigeminal Neuralgia and Facial Pain Imaging. *Curr Pain Headache Rep* 2015;19:19. doi:10.1007/s11916-015-0495-y.

Grushka M, Sessle B, & Howley T. Psychophysical assessment of tactile, pain and thermal sensory function in burning mouth syndrome. *Pain* 1987;28:169.

Gupta J, Park SS, Bondy B, Felner EI, & Prausnitz MR. Infusion pressure and pain during microneedle injection into skin of human subjects. *Biomaterials* 2011;32:6823–31. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.061.

Haq MI, Smith E, John DN, Kalavala M, Edwards C, Anstey A, et al. Clinical administration of microneedles: Skin puncture, pain and sensation. *Biomed Microdevices* 2009;11:35–47. doi:10.1007/s10544-008-9208-1.

Harris D, & Robinson JR. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *J*

Pharm Sci 1992;81:1–10.

Hassan N, Ahad A, Ali M, & Ali J. Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2010;7:97–112. doi:10.1517/17425240903338758.

Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:16–28. doi:10.1016/j.addr.2011.02.008.

Hjermstad MJ, Fayers PM, Haugen DF, Caraceni A, Hanks GW, Loge JH, et al. Studies Comparing Numerical Rating Scales, Verbal Rating Scales, and Visual Analogue Scales for Assessment of Pain Intensity in Adults: A Systematic Literature Review. *J Pain Symptom Manage* 2011;41:1073–93. doi:10.1016/j.jpainsymman.2010.08.016.

Ita K. Transdermal delivery of drugs with microneedles—potential and challenges. *Pharmaceutics* 2015;7:90–105. doi:10.3390/pharmaceutics7030090.

Kochhar JS, Lim WXS, Zou S, Foo WY, Pan J, & Kang L. Microneedle integrated transdermal patch for fast onset and sustained delivery of lidocaine. *Mol Pharm* 2013;10:4272–80. doi:10.1021/mp400359w.

Komiyama O, & De Laat A. Tactile and pain thresholds in the intra- and extra-oral regions of symptom-free subjects. *Pain* 2005;115:308–15. doi:10.1016/j.pain.2005.03.006.

Kulkarni U, Mahalingam R, Pather SI, Li X, & Jasti B. Porcine Buccal Mucosa as an In Vitro Model: Relative Contribution of Epithelium and Connective Tissue as Permeability Barriers. *J Pharm Sci* 2009;98:471–83. doi:10.1002/jps.21436.

Lee IC, Lin WM, Shu JC, Tsai SW, Chen CH, & Tsai MT. Formulation of two-layer dissolving polymeric microneedle patches for insulin transdermal delivery in diabetic mice. *J Biomed Mater Res - Part A* 2017;105:84–93. doi:10.1002/jbm.a.35869.

Lesch CA, Squier CA, Cruchley A, Williams DM, & Speight P. The Permeability of Human Oral Mucosa and Skin to Water. *J Dent Res* 1989;68:1345–9. doi:10.1177/00220345890680091101.

Ma Y, Boese SE, Luo Z, Nitin N, & Gill HS. Drug coated microneedles for minimally-invasive treatment of oral carcinomas: development and in vitro evaluation. *Biomed*

Microdevices 2015;17. doi:10.1007/s10544-015-9944-y.

Ma Y, & Gill HS. Coating solid dispersions on microneedles via a molten dip-coating method: Development and in vitro evaluation for transdermal delivery of a water-insoluble drug. *J Pharm Sci* 2014a;103:3621–30. doi:10.1002/jps.24159.

Ma Y, & Gill HS. Coating Solid Dispersions on Microneedles via a Molten Dip-Coating Method: Development and In Vitro Evaluation for Transdermal Delivery of a Water-Insoluble Drug. *J Pharm Sci* 2014b;103:3621–30. doi:10.1002/jps.24159.

Ma Y, Tao W, Krebs SJ, Sutton WF, Haigwood NL, & Gill HS. Vaccine delivery to the oral cavity using coated microneedles induces systemic and mucosal immunity. *Pharm Res* 2014;31:2393–403. doi:10.1007/s11095-014-1335-1.

Okayasu I, Komiyama O, Ayuse T, & De Laat A. Tactile sensory and pain thresholds in the face and tongue of subjects asymptomatic for oro-facial pain and headache. *J Oral Rehabil* 2014;41:875–80. doi:10.1111/joor.12213.

Pienaar ED, Young T, & Holmes H. Interventions for the prevention and management of oropharyngeal candidiasis associated with HIV infection in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD003940. doi:10.1002/14651858.CD003940.pub3.

Pieretti S, Di Giannuario A, Di Giovannandrea R, Marzoli F, Piccaro G, Minosi P, et al. Gender differences in pain and its relief. *Ann Ist Super Sanita* [s.d.];52:184–9. doi:10.4415/ANN\_16\_02\_09.

Prausnitz MR. Microneedles for transdermal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:581–7. doi:10.1016/j.addr.2003.10.023.

Prausnitz MR, Mitragotri S, & Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:115–24. doi:10.1038/nrd1304.

Prestin S, Rothschild SI, Betz CS, & Kraft M. Measurement of epithelial thickness within the oral cavity using optical coherence tomography. *Head Neck* 2012;34:1777–81. doi:10.1002/hed.22007.

Reed KL, Malamed SF, & Fonner AM. Local anesthesia part 2: technical considerations. *Anesth Prog* 2012;59:127–36; quiz 137. doi:10.2344/0003-3006-59.3.127.

Serpe L, Jain A, de Macedo CG, Volpato MC, Groppo FC, Gill HS, et al. Influence of salivary washout on drug delivery to the oral cavity using coated microneedles: An in vitro evaluation. *Eur J Pharm Sci* 2016;93:215–23. doi:10.1016/j.ejps.2016.08.023.

Serpe L, Muniz BV, Pita Dos Santos C, Batista da Silva C, Volpato MC, Groppo FC, et al. Full thickness intraoral mucosa barrier models for in vitro drug permeation studies employing microneedles. *J Pharm Sci* 2018. doi:10.1016/j.xphs.2018.12.004.

Sessle B, Lavigne GJ., Lund JP, & Dubner R. *Orofacial pain*. 2<sup>o</sup> ed. Canada: quintessence; 2008.

Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharm Sci* [s.d.];1:15–30.

Silverthorn DU. *Fisiologia Humana*. 7<sup>o</sup> ed. artmed; 2017.

Squier CA. Effect of enzyme digestion on the permeability barrier in keratinizing and non-keratinizing epithelia. *Br J Dermatol* 1984;111:253–64.

Squier CA, & Brogden K. *Human Oral Mucosa*. 1<sup>o</sup> ed. wiley-blackwell; 2011.

Squier CA, Cox P, & Wertz PW. Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. *J Invest Dermatol* 1991;96:123–6.

Squier CA, & Hall BK. The permeability of mammalian nonkeratinized oral epithelia to horseradish peroxidase applied in vivo and in vitro. *Arch Oral Biol* 1984;29:45–50.

Squier CA, & Hopps RM. A study of the permeability barrier in epidermis and oral epithelium using horseradish peroxidase as a tracer in vitro. *Br J Dermatol* 1976;95:123–9.

Takeuchi K, & Kim B. Functionalized microneedles for continuous glucose monitoring. *Nano Converg* 2018;5:28. doi:10.1186/s40580-018-0161-2.

Wang T, & Wang N. Biocompatible Mater Constructed Microneedle Arrays as a Novel Vaccine Adjuvant- Delivery System for Cutaneous and Mucosal Vaccination. *Curr Pharm Des* 2015;21:5245–55.

Wei R, Simon L, Hu L, & Michniak-Kohn B. Effects of iontophoresis and chemical enhancers on the transport of lidocaine and nicotine across the oral mucosa. *Pharm Res*

2012;29:961–71. doi:10.1007/s11095-011-0636-x.

Wermeling DP, Banks SL, Hudson DA, Gill HS, Gupta J, Prausnitz MR, et al. Microneedles permit transdermal delivery of a skin-impermeant medication to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2058–63. doi:10.1073/pnas.0710355105.

Zhen Y, Ma X, Wang T, Li S, Wei B, & Wang N. Mannosylated and lipid A-incorporating cationic liposomes constituting microneedle arrays as an effective oral mucosal HBV vaccine applicable in the controlled temperature chain. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2015;126:520–30. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.01.005.

Zylberberg C, & Matosevic S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv* 2016;23:3319–29. doi:10.1080/10717544.2016.1177136.

## APÊNDICES

### Apêndice 1 - Certificado de apresentação no IADR.

05/04/2017

<https://www.xpressreg.net/register/iadr0317/cerhtml/templates/print.asp?certificateID=3885&b=203830>

 <h1 style="margin: 0;">IADR</h1> <p style="margin: 0;">International Association for Dental Research</p>	
<h2><u>VERIFICATION OF ATTENDANCE AND PRESENTATION</u></h2>	
<p>The International Association for Dental Research verifies that:</p>	
<h3>Stephany Santos</h3>	
<p>attended the IADR/AADR/CADR General Session in San Francisco, California, March 22-25, 2017, and presented the following research:</p>	
<h3>In Vitro Performance of Ibuprofen Thermosensitive-gels for Topical Oral Application</h3>	
<p><b>ADA CERP</b>®   Continuing Education Recognition Program</p> <p><small>ADA CERP is a service of the American Dental Association to assist dental professionals in identifying quality providers of dental education. ADA CERP does not approve or endorse individual courses or instructors, nor does it imply acceptance of credit hours by boards of dentistry.</small></p> <p><small>Concerns or complaints about a CE provider may be directed to the provider or the Commission for Continuing Education Provider Recognition at <a href="http://ADA.org/CERP">ADA.org/CERP</a>.</small></p>	<p>The International Association for Dental Research is an ADA CERP Recognized Provider.</p>  <p>Christopher H. Fox, D.M.D., D.M.Sc. Executive Director</p>

<https://www.xpressreg.net/register/iadr0317/cerhtml/templates/print.asp?certificateID=3885&b=203830>

1/1

**Apêndice 2 - Certificado de apresentação no SBPqO 2017.**

14/06/2018

SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica



**Apêndice 3 - Certificado de apresentação no SBPqO 2018.**

18/09/2018

SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

**35ª REUNIÃO ANUAL DA SBPqO**

Expo D. Pedro - Campinas/SP

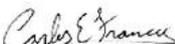
Pré-Evento: 01 de setembro 2018

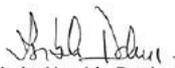
Reunião Anual: 02 a 04 de setembro 2018

**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho **A00209 - USO DE MICROAGULHAS NA CAVIDADE ORAL COM NOVA ESTRATÉGIA DE "DRUG DELIVERY": AVALIAÇÃO DA DOR EM ENSAIO CLÍNICO PILOTO** de Santos SC\*, Moreira NCF, Augusto GGX, Abdalla HB, Volpato MC, Groppo FC, Gill H Leite MFMB foi apresentado

na 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica,  
no período de 01 a 04 de Setembro de 2018

  
Carlos Eduardo Francci

  
Isabela Almeida Pordeus

Apêndice 4 - Certificado de apresentação no AAPS 2018.



## *Certificate of Presentation*

*This certificate acknowledges that*

*Stephany Santos*

*Presented a Poster Titled*

*Evaluation of pain from microneedle use in the oral cavity of human  
volunteers*

*AAPS PharmSci 360*

*November 4–7, 2018*

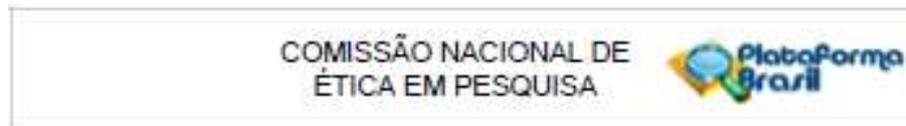
*Binodh DeSilva*

---

Binodh DeSilva, Ph.D.  
AAPS President

## ANEXOS

## Anexo 1 - Certificado de aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.



## PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

## DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da dor e a eficácia anestésica através da aplicação tópica de microagulhas: ensaio clínico randomizado.  
Evaluation of pain and anesthetic efficacy after topical application of microneedles: a randomized clinical trial.

**Pesquisador:** Michelle Franz Montan Braga Leite

**Área Temática:** Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;  
Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

**Versão:** 10

**CAAE:** 42926115.3.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

**Patrocinador Principal:** Texas Tech University  
Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.929.696

## Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1199277\_E4.pdf de 05/09/2018) e/ou do Projeto Detalhado (Projeto\_de\_Pesquisa\_E4\_corrigido.doc, de 05/09/2018).

## INTRODUÇÃO

Vários avanços têm ocorrido no tratamento odontológico, no entanto, até agora, anestésicos tópicos comercialmente disponíveis não promovem uma anestesia superficial eficiente, e a dor associada à aplicação da anestesia local (inserção da agulha e injeção de solução) ainda é um procedimento temeroso na Odontologia (Franz-Montan et al., 2012a). A anestesia local induz ansiedade e medo na maioria dos pacientes, o que pode levar o paciente a necessitar de aconselhamento psicológico e sedação para realizar o tratamento ou, não raro, para evitar atendimento odontológico de rotina. Além disso, o medo está associado a uma qualidade insatisfatória da saúde bucal, redução do atendimento odontológico, e aumento do estresse ao

Endereço: BRINTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar  
Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-040  
UF: DF Município: BRASÍLIA  
Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer 3.209.698

Outros	Carta_emenda.pdf	19/04/2016 17:07:58	Michelle Franz Montan Braga Leite	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_novo_emenda.pdf	19/04/2016 17:05:29	Michelle Franz Montan Braga Leite	Acelto
Outros	CORCompleto 028-15.pdf	10/04/2016 10:49:39		Acelto
Outros	CEPCompleto-028-15.pdf	16/03/2015 11:31:46		Acelto
Outros	Curriculo.doc	11/03/2015 17:26:22		Acelto
Outros	Orçamento.pdf	11/03/2015 17:24:46		Acelto
Outros	Declaração dos pesquisadores.pdf	11/03/2015 17:24:34		Acelto
Outros	Declaração da instituição.pdf	11/03/2015 17:24:20		Acelto

Situação do Parecer:  
Aprovado

BRASÍLIA, 01 de Outubro de 2018

Assinado por:  
**FRANCISCA VALDA DA SILVA**  
(Coordenador(a))

Endereço: SRNTV 701, Via W 8 Norte - Edifício PO 700, 3º andar  
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-040  
 UF: DF Município: BRASÍLIA  
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

Página 26 de 26

Anexo 2 - Registro no site *ClinicalTrial.gov*

**ClinicalTrials.gov PRS**  
*Protocol Registration and Results System*

**ClinicalTrials.gov PRS DRAFT Receipt (Working Version)**

Last Update: 02/25/2019 13:12

**ClinicalTrials.gov ID: NCT03855397**

**Study Identification**

Unique Protocol ID: CAAE: 42926115.3.0000.5418

Brief Title: Pain and Safety of Microneedles in Oral Cavity

Official Title: Pain and Safety of Microneedle Application in the Oral Cavity of Human Volunteers

Secondary IDs:

**Study Status**

Record Verification: January 2019

Overall Status: Completed

Study Start: January 16, 2018 [Actual]

Primary Completion: May 25, 2018 [Actual]

Study Completion: December 16, 2018 [Actual]

**Sponsor/Collaborators**

Sponsor: University of Campinas, Brazil

Responsible Party: Principal Investigator

Investigator: Michelle Franz Montan Braga Leite, DDS, MSc, PhD [mmontan]

Official Title: Principal Investigator

Affiliation: University of Campinas, Brazil

Collaborators: Texas Tech University

**Oversight**

U.S. FDA-regulated Drug: No

U.S. FDA-regulated Device: No

U.S. FDA IND/IDE: No

Human Subjects Review: Board Status: Approved

Approval Number: 42926115.3.0000.5418

Board Name: Brazilian National Commission on Ethics in Research

Board Affiliation: Brazilian National Health Council

Phone: 55 (61) 3315-5878

Email: conep.cep@saude.gov.br

Address:

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP

## Anexo 3 - Relatório de originalidade Turnirín

## AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE DOR DECORRENTE DA APLICAÇÃO DE MICROAGULHAS NA CAVIDADE BUGAL DE VOLUNTÁRIOS SADIOS.

### RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

<b>2%</b>	<b>3%</b>	<b>4%</b>	<b>3%</b>
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

### FONTES PRIMÁRIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.unicamp.br</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>2</b>	Luciano Serpe, Bruno Vilela Muniz, Cleiton Pita dos Santos, Camila Batista da Silva et al. "Full thickness intraoral mucosa barrier models for in vitro drug permeation studies employing microneedles", Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018 Publicação	<b>1%</b>
<b>3</b>	Wang, Xueting, Ning Wang, Ning Li, Yuanyuan Zhen, and Ting Wang. "Multifunctional particle-constituted microneedle arrays as cutaneous or mucosal vaccine adjuvant-delivery systems", Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2016. Publicação	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>link.springer.com</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>

< 1%