UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

João Pedro Galli Poleti

“Efeitos da mistura lidocaína/prilocaína em filmes de alginato de sódio/ácido hialurônico sobre queratinócitos humanos. Estudo in vitro.”

Piracicaba

2019

João Pedro Galli Poleti

“Efeitos da mistura lidocaína/prilocaína em filmes de alginato de sódio/ácido hialurônico sobre queratinócitos humanos. Estudo in vitro.”

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Coorientador: Ms. Klinger de Souza Amorim

Este exemplar corresponde à versão final do trabalho de conclusão de curso apresentado pelo aluno João Pedro Galli Poleti e orientado pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.

Piracicaba

2019

Ficha catalográfica

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

P758e

Poleti, João Pedro Galli, 1996-
Efeitos da mistura lidocaína/prilocaína em filmes de alginato de sódio/ácido hialurônico sobre queratinócitos humanos. Estudo in vitro / João Pedro Galli Poleti. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Coorientador: Klinger de Souza Amorim.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anestésicos locais. 2. Biopolímeros. 3. Biocompatibilidade. I. Groppo, Francisco Carlos,1966-. II. Amorim, Klinger de Souza,1990-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:
Local anesthetics
Biopolymers
Biocompatibility
Titulação: Cirurgião-Dentista
Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2019

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, João Carlos e Rosana, à minha irmã, Isabella, e à minha namorada, Denise, por todo apoio, força, carinho e compreensão dados para que eu chegasse até aqui.

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais, João Carlos e Rosana e à minha irmã Isabella, que sempre estiveram ao meu lado dando apoio e acreditando em mim, sempre com paciência e muito amor, demonstrando mais uma vez serem os melhores do mundo.

À minha namorada, Denise, que sempre esteve ao meu lado todos os dias, desde meu segundo ano de faculdade, dando apoio e me consolando em momentos difíceis.

Ao meu professor e orientador Dr. Francisco Carlos Groppo, e co-orientador Klinger de Souza Amorim por toda paciência, apoio, dedicação e disposição em colaborar com o meu aprendizado.

Às instituições de fomento SAE e Pibic por todo o apoio dado durante a realização deste projeto.

Aos meus pacientes da graduação, que permitiram meu aprendizado e foram de fundamental importância para a obtenção de meu título como Cirurgião-dentista pela FOP- Unicamp.

RESUMO

A anestesia local busca constantemente o tratamento o mais próximo possível do “sem dor”. Novos sistemas de liberação compostos por biopolímeros se mostram como uma alternativa promissora para anestesia tópica, dentre eles o ácido hialurônico e o alginato. Foram confeccionados 3 tipos de filmes através da técnica “solvente casting” com proporções poliméricas diferentes associados a mistura de cloridrato de lidocaína e cloridrato de prilocaína nas concentrações de 250µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml e 1500 µg/ml. Os filmes foram submetidos a ensaios com cultura celular de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). As células foram incubadas a 37ºC por 6h e 24h e a viabilidade celular foi medida através do método de redução do MTT. Os valores de viabilidade celular foram máximos para os filmes sem anestésicos locais, o filme na proporção de 1:1 apresentou a melhor viabilidade celular nos dois tempos de exposição, o filme com proporções 1:3 apresentou ótima viabilidade em 6 horas de exposição e menores valores 24 horas, o filme de proporção 3:1 apresentou as menores taxas de viabilidade dentre os três filmes, entretanto com valores de viabilidade acima de 75%. Os filmes em estudo associados aos anestésicos locais se mostraram com toxicidade aceitável para futura utilização e apresentaram máxima viabilidade quando livre de anestésicos locais, porém outros ensaios ainda são necessários.

Palavras-chave: anestésicos locais, biopolímeros, biocompatibilidade

ABSTRACT

Local anesthesia constantly seeks treatment as close as possible to “pain free”. New delivery systems composed of biopolymers are a promising alternative for topical anesthesia, including hyaluronic acid and alginate. Three types of films were made by solvent casting with different polymeric proportions associated with the mixture of lidocaine hydrochloride and prilocaine hydrochloride at concentrations of 250 µg / ml, 500 µg / ml, 750 µg / ml, 1000 µg / ml and 1500 µg / ml. The films were subjected to cell culture assays of immortalized human keratinocytes (HaCaT). Cells were incubated at 37oC for 6h and 24h and cell viability was measured by the MTT reduction method. Cell viability values were maximum for films without local anesthetics, the 1: 1 ratio film showed the best cell viability at both exposure times, the 1: 3 ratio film showed optimal viability at 6 hours of exposure and shorter. At 24 hours, the 3: 1 ratio film presented the lowest viability rates among the three films, however, with viability values above 75%. The films studied associated with local anesthetics were acceptable for future use and showed maximum viability when free of local anesthetics, but further trials are still needed.

Keyword: local anesthetics, biopolymers, biocompatibility

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 9

2 REVISÃO DE LITERATURA.....10

3 PROPOSIÇÃO 13

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 14

4.2.....15

4.3.....16

4.4 16

4.5 16

5 RESULTADOS 18

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....20

REFERÊNCIAS 23

ANEXO 1: Verificação de originalidade e prevenção de plágio 26

ANEXO 2: Iniciação científica 27

1 INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais são fármacos muito utilizados para o controle da dor e novas formulações são constantemente pesquisadas e desenvolvidas (Strichartz, 2008). Essas pesquisas buscam o tratamento mais próximo possível do “sem dor”, mas, no entanto, o próprio ato da anestesia com a penetração da agulha já é associado à dor (Munshiet al.,2001).

Embora os anestésicos locais sejam utilizados para o bloqueio temporário da condutividade nervosa, também têm ação em alvos que podem modular vias celulares relacionadas à resposta inflamatória, cicatrização, apoptose e necrose celular (Cassuto et al., 2006). Enquanto a procura pela molécula ideal permanece um desafio, novas formulações anestésicas a partir de moléculas conhecidas vêm sendo desenvolvidas utilizando sistemas de liberação controlado de fármacos, tais como lipossomos e ciclodextrinas, com o objetivo de prolongar o efeito dos anestésicos locais, melhorar a solubilidade e reduzir a sua toxicidade (Franz-Montan et al., 2016). Mesmo as novas formulações baseadas em lipossomos e ciclodextrinas apresentaram toxicidade ou problemas com a eficácia e, assim, a busca por novas formulações ainda é imperiosa.

Alguns polímeros podem ser construídos na forma de filmes, sendo uma combinação interessante entre o ácido hialurônico (HA) e alginato de sódio. O alginato é um polissacarídeo derivado da parede celular de algas marrons, e por isso apresentando alta biocompatibilidade. Além de sua função na indústria alimentícia, já apresenta aplicação direta em Odontologia como componente de biomateriais para uso em regeneração tecidual guiada em periodontia, tais como o Emdogain gel, o qual apresenta uma matriz de alginato como polímero base.

Este componente tem ainda excelentes propriedades muco adesivas. Por ser um polímero aniônico, quando em contato com a saliva pode reticular, aumentando a resistência mecânica, o tempo de permanência na mucosa e permite o controle das taxas de liberação de fármacos. O alginato de sódio se liga ionicamente por ligações cruzadas por cátions divalentes. Este composto tem encontrada grande aplicação em bioengenharia. Entretanto, o hidrogel produzido pelo alginato sem nenhuma modificação não é adequado para aplicação para adesão celular, por exemplo, e, para melhorar essa propriedade, o composto tem sido misturado com ácido hialurônico entre outras moléculas e polímeros (Ansari et al., 2017).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Albertini et al (2013) realizou uma das pesquisas pioneiras referentes ao desenvolvimento de um curativo multi-composto capaz de controlar a liberação de um API solúvel em água (lidocaína HCl) por vários dias. O curativo preparado é uma matriz microestruturada esponjosa, esta obtida por desidratação de substâncias realizada em baixas temperaturas por 3 proporções de quitosana e alginato (1:1,1:3 e 3:1), e que incorpora micropartículas lipídicas sólidas (SLMs). As matrizes assciadas a droga foram observadas quanto à capacidade de absorção de água, aumento de volume , carga de droga, formato e perfis de liberação. As SLMs foram preparadas em duas cargas de fármacos diferentes (5% e 25%, p/p) pela tecnologia de congelamento por pulverização e foram então incorporadas nas matrizes esponjosas. A caracterização dos SLMs evidenciou sua forma, liberação controlada e modificação do estado cristalino do fármaco. Comparando os perfis de liberação das microestruturas esponjosas carregadas com SLMs, as matrizes com proporção de quitosana / alginato 1: 3 apresentaram um perfil de liberação sustentada com o menor efeito de explosão, mostrando assim a utilidade do alginato como drug delivery. Em seguida, outras substânciais ainda foram adicionadas a matriz para melhorar as propriedades de cicatrização do composto. A plataforma multi-composta final foi capaz de promover o crescimento de fibroblastos mantendo sua característica de liberação prolongada.

Baus et al (2019) pesquisou os métodos in vitro para a avaliação de hidrogéis aderentes a mucosa quanto a permanência na mucosa bucal em seres humanos. Para a realização da pesquisa foi realizada a mistura de hidrogéis, dentre eles o alginato de sódio (ALG) e sal de sódio do ácido hialurônico (HA), materiais de escolha para os filmes utilizados em nossa pesquisa. Os mesmos foram observados quanto ao sinergismo reológico, características e propriedades, tendo os testes de mucoadesão sido realizados em mucosa suína e na cavidade oral de voluntários. O que pode ser observado foi que o sinergismo reológico e tempo de residência de hidrogéis para aplicação bucal foi bom em ambos os grupos, tendo o tempo de residência uma boa aplicabilidade in vivo e consequentemente agindo com drug delivery. Dessa maneira, há ser um forte indício para o desenvolvimento de diferentes formulações intraorais que possam ser utilizadas em seres humanos.

Chen at al (2018) promoveu um estudo que investigou a utilização do alginato de sódio combinado ao hialuronato de sódio como arcabouço associado a barberina no reparo osteocondral. O teste para observar a cicatrização osteocondral através do arcabouço desenvolvido foi realizado in vivo. Os resultados mostraram que o sistema poderia regenerar simultaneamente tanto a cartilagem quanto o osso subcondral, tendo sido observado que este foi parcialmente reparado pela ativação da via de sinalização Wnt e a cartilagem foi protegida da degeneração pela regulação positiva da autofagia, podendo-se assim concluir que o arcabouço de alginato de sódio, hialuronato de sódio e barberina é promissor para o reparo de defeitos subcondrais.

Dausse et al (2003) avaliou a utilização de vários polímeros como biomateriais de preenchimento e reparo, sendo realizado em um modelo de rato com defeitos na cartilagem. Foi analisado um hidrogel, composto de ácido hialurônico, substituído covalentemente por cadeias hidrofóbicas (HA12 e HA18) e uma esponja de alginato sozinho (Asp) ou combinado com HA (AHAsp) ou combinado com HA e condrócitos (HYBsp) e seus efeitos em lesões cartilaginosas da tróclea femural, patela e côndilo de ratos. Foi então observada reparação macroscópia similar a do AHAsp e HA18 em relação ao com alginato e após avaliação química, pode ser observada a presença de proteoglicanos nas zonas reparadas e de controle. Sendo assim concluiu-se que a matriz obtida através dos hidrogéis ou esponjas mostrou ser colonizada por células, estas responsáveis pela síntese de uma matriz com uma grande quantidade de ácido hialurônico, porém bioquimicamente, ainda diferente das células originais. Dessa maneira o autor finaliza o trabalho relatando sobre a importância das observações tanto micro quanto macroscópicas.

Franz-Montan et al (2016) analisaram a utilização de anestésicos locais e outros métodos para redução da dor a punção da agulha durante procedimentos odontológicos. Os autores iniciam o texto realizando uma introdução quanto a utilização de anestesia local (AL) para a busca para um procedimento odontológico livre de dor e que, apesar da utilização de anestésicos tópicos para a redução da dor á punção da agulha ainda não conseguem controlar a dor da injeção do anestésicos em determinados lugares, como por exemplo no palato. Para a melhora da eficácia da anestesia tópica é possível a utilização agentes químicos, como carreadores nanoestruturados (lipossomos, oligossacarídeos cíclicos, nanopartículas lipídicas, formulações farmacêuticas tópicas baseadas em polímeros, dentre outas), e também de métodos físicos (crioanestesia, estímulos mecânicos como vibração ou pressão, e

as mais recentes iontoforeses e microagulhas). A conclusão de toda a análise realizada no trabalho é de que diferentes DDSs e formas de dosagem farmacêutica foram desenvolvidos com sucesso com o objetivo de aumentar a eficácia da anestesia tópica na mucosa bucal, e que apesar de terem sido realizados apenas alguns ensaios clínicos in vivo, esses estudos têm confirmado as melhorias farmacológicas. O desenvolvimento contínuo de novos sistemas e formulações para uso clínico na cavidade oral ajudarão a alcançar melhorias significativas na anestesia oral tópica.

Hutmacher et al (2001) relatou que a utilização de células autógenas para transplantes é um tratamento promissor, pois reduz a quantidade de complicações, como rejeição imunológica, transferência de patógenos, dentre outros problemas. Parte de tal sucesso deve-se a um arcabouço biocompatível, que degrada-se e reabsorve, permitindo que as estruturas duras e moles cresçam através de proliferação celular e mantenham sua diferenciação. Baseando-se em trabalhos anteriores e o próprio conhecimento na área, os autores relatam que macromoléculas de origem natural, como colágeno, alginato, agarose, derivados do ácido hialurônico, quitosana e cola de fibrina têm sido utilizados como arcabouços, assim como compostos artificiais desenvolvidos pelo homem. Sendo assim os materiais utilizados para arcabouço tem sido cada vez mais estudados, pois essa é a maneira mais eficiente para qual se possa guiar a prolifereção e diferenciação celular no tecido desejado.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos e toxicidade da mistura lidocaína/prilocaína em filmes de alginato de sódio/ácido hialurônico sobre queratinócitos humanos imortalizados espontaneamente (HaCaT), para possível futura aplicabilidade do filme com anestésicos locais sobre feridas e pele integra.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Formulações estudadas e preparo dos filmes:

Em parceria com o Prof. Dr. Marlos Chorilli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, estabelecemos metodologia para confecção de filmes a partir da mistura de ácido hialurônico e alginato de sódio, usando a técnica "solvente casting". Utilizamos 3 proporções diferentes de ambos os polímeros, com e sem anestésicos, conforme as formulações abaixo:

a) Filmes de alginato e ácido hialurônico (HA, hialuronato de sódio, 360 kDa, Life Core Biomedicals – USA) na proporção de 1:1 impregnados com 25mg de lidocaína (cloridrato de lidocaína, Sigma) e 25 mg de prilocaína (cloridrato de prilocaína, Sigma).
b) Filmes de alginato e ácido hialurônico (HA, hialuronato de sódio, 360 kDa, Life Core Biomedicals – USA) na proporção de 3:1 impregnados com 25mg de lidocaína (cloridrato de lidocaína, Sigma) e 25 mg de prilocaína (cloridrato de prilocaína, Sigma).
c) Filmes de alginato e ácido hialurônico (HA, hialuronato de sódio, 360 kDa, LifeCoreBiomedicals – USA) na proporção de 1:3 impregnados com 25mg de lidocaína (cloridrato de lidocaína, Sigma) e 25 mg de prilocaína (cloridrato de prilocaína, Sigma).

Os filmes com a mistura de ácido hialurônico e alginato contendo os anestésicos lidocaína e prilocaína foram preparados pela técnica "solvente casting". Dispersões dos polímeros isolados foram preparadas em água purificada na concentração de 1,5% (m/v) mediante agitação magnética. Após completa homogeneização, as dispersões foram misturadas em três diferentes proporções (1:1, 1:3 e 3:1), mantendo-se a agitação constante por 30 min para permitir a interação dos compostos.

Os fármacos lidocaína e prilocaína foram adicionados às blendas, juntamente com glicerina, usada como plastificante na concentração final de 5%, mantendo-se a agitação por mais 30 min. As dispersões obtidas foram vertidas em placas de Petri, as quais foram secas em estufa à temperatura de 55°C por 24h (Figura 2).

Os filmes obtidos nesta técnica nos permitiram adicionar até 300mg de anestésicos locais quando utilizado um total de 450 mg em massa polimérica e, ainda assim, permaneciam estáveis.

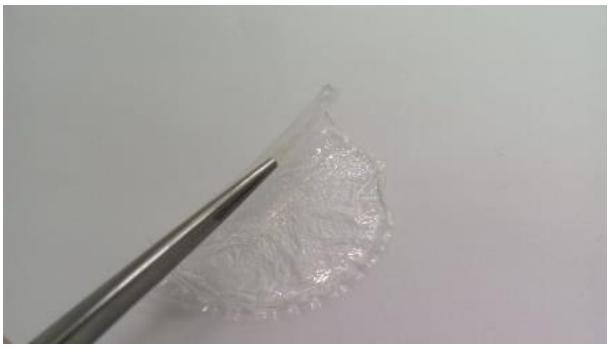


Figura 1: Filme maleável obtido no estudo.

Figura 2. Dispersão sendo vertida na placa de Petri (A). Dispersão vertida nas placas de Petri (B). Filme após secagem (C). Filme sendo removido da placa após secagem (D).

4.2 Cultura celular:

Foram utilizados queratinócitos humanos imortalizados espontaneamente da linhagem HaCaT. Essas células correspondem ao tipo celular predominante nos tecidos de revestimento. As células foram obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, Associação Técnico Científica Paulo Ehrlich.

A HaCaT foi mantida em Meio Eagle de Dulbecco modificado-DMEM (GIBCO®, United Kingdom) acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO®) e penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células foram cultivadas em placas de petri para cultura de tecido de 61 cm^2 (TPP®) em atmosfera de 5% de CO_2 a 37ºC. A cultura foi duplicada duas vezes por semana.

4.3 Condições experimentais:

Células HaCaT crescidas foram expostas aos filmes em estudo 5 concentrações diferentes de anestésicos locais (cloridrato de lidocaína + cloridrato de prilocaína em 1500µg/ml, 1000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml e 125µg/ml). Um grupo controle foi obtido por células tratadas como filme livre de anestésicos locais e o controle positivo foi realizado com um grupo exposto somente ao meio de cultura utilizado no cultivo destas células. As células foram incubadas a 37ºC por 6h e 24h. Terminado os períodos de incubação, a viabilidade celular foi medida.

4.4 Viabilidade celular:

As células cultivadas foram submetidas a uma solução de tripsina e uma concentração de $5x10^4$/mL dos tipos celulares foram dispostos em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 18 horas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37ºC. Posteriormente foram adicionados os anestésicos locais livres ou associados aos carreadores nas diferentes concentrações. Terminadas as incubações (6h e 24h), a viabilidade celular foi estimada utilizando o método da redução do MTT.

O teste de viabilidade foi executado conforme as instruções do fabricante. 200µL da solução preparada com o MTT foi pipetada em cada poço da placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 3 horas e, após esse período, as absorbâncias lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm com correção para 690nm.

4.5 Análise da citotoxicidade por microscopia de fluorescência:

Com os filmes obtidos foram realizadas análises de citotoxicidade por redução do MTT. Para tanto, foram utilizadas células HaCat em placas de 96 poços. Os filmes foram cortados e foram dissolvidos em meio de cultura utilizado no cultivo das células Hacat (DMEM + Soro fetal Bovino 10 %). Foram utilizadas 5 concentrações diferentes de anestésicos locais (cloridrato de lidocaína + cloridrato de prilocaína em 1500µg/ml, 1000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml e 125µg/ml) de cada tipo de filme (proporções poliméricas diferentes), além do filme livre sem anestésicos locais.

Foi utilizada uma placa de 96 poços para cada filme, uma linha com 9 poços para cada grupo distribuídos de acordo com as diferentes concentrações de anestésicos locais, além de um grupo controle que continha somente o meio de cultura para as células, sem adição de qualquer tratamento.

Foram realizados testes de MTT dos três filmes, cada um com as 5 concentrações diferentes de anestésicos locais, além dos testes com o filme livre de anestésicos locais. Todos os testes com MTT foram realizados em triplicata para cada grupo usando nove poços em cada experimento, totalizando um n de 27 para cada grupo. Após incubação em tratamento por 6h as placas foram tratadas com MTT e novamente incubadas por 3 horas para posterior leitura em leitor de ELISA e avaliação da viabilidade celular. Embora não seja usual ou prático manter anestésico local aplicado topicamente por um período de 24 horas, o mesmo procedimento realizado após 6 horas de exposição foi também realizado deixando os filmes por um período de 24 horas, visando observar sua toxicidade no extremo de uso.

5 RESULTADOS

Conforme pode ser observado nos gráficos abaixo, o filme de proporção 3:1 apresentou as menores taxas de viabilidade dentre os três filmes, sendo que a viabilidade foi aparentemente influenciada pela concentração dos anestésicos. No entanto, o filme ainda causou viabilidade maior que 75%, mesmo em seus valores médios mais baixos.

Já o filme com proporções 1:3 apresentou ótima viabilidade em todas as concentrações quando a exposição foi de 6 horas. Quando a exposição ao filme foi de 24 horas, apresentou uma aparente queda linear nos valores de viabilidade celular a partir da concentração 250µg/ml. Tal comportamento pode se dar tanto em função da concentração dos anestésicos, como em função do comportamento dos filmes com relação a sua cinética de liberação.

O filme na proporção de 1:1, de acordo com o que pode ser observado no gráfico 3, teve a melhor viabilidade celular em relação aos outros filmes, tendo mantido sua concentração estável no período estudado, mesmo após 24 horas.

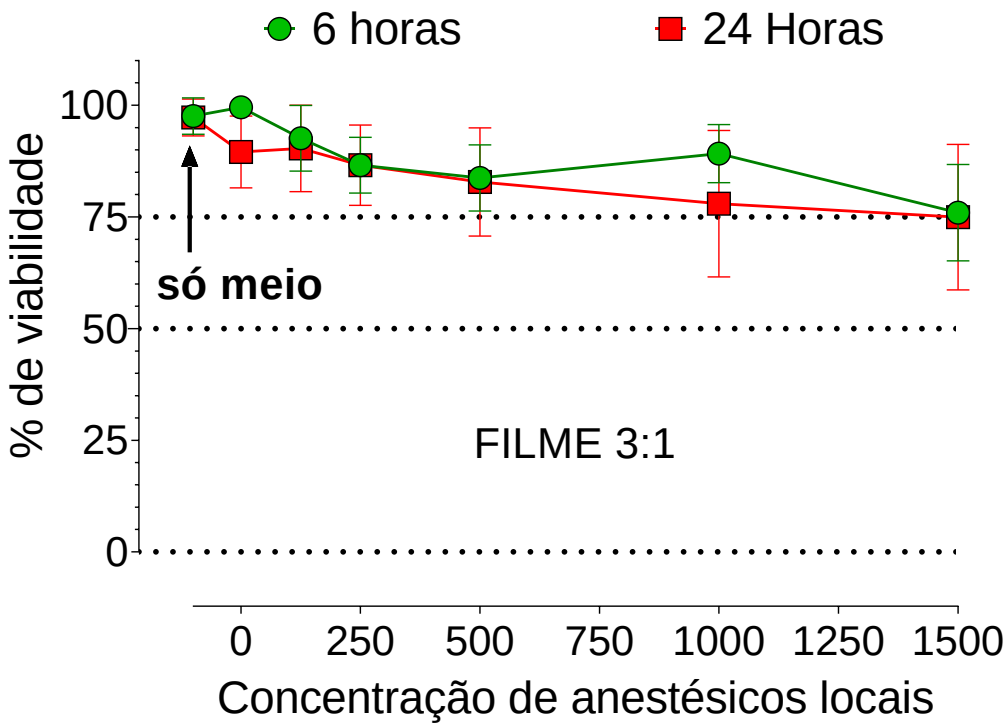


Gráfico 1. Viabilidade celular do filme nas proporções poliméricas 3:1 (AH/ALG) e suas diferentes concentrações anestésicas.

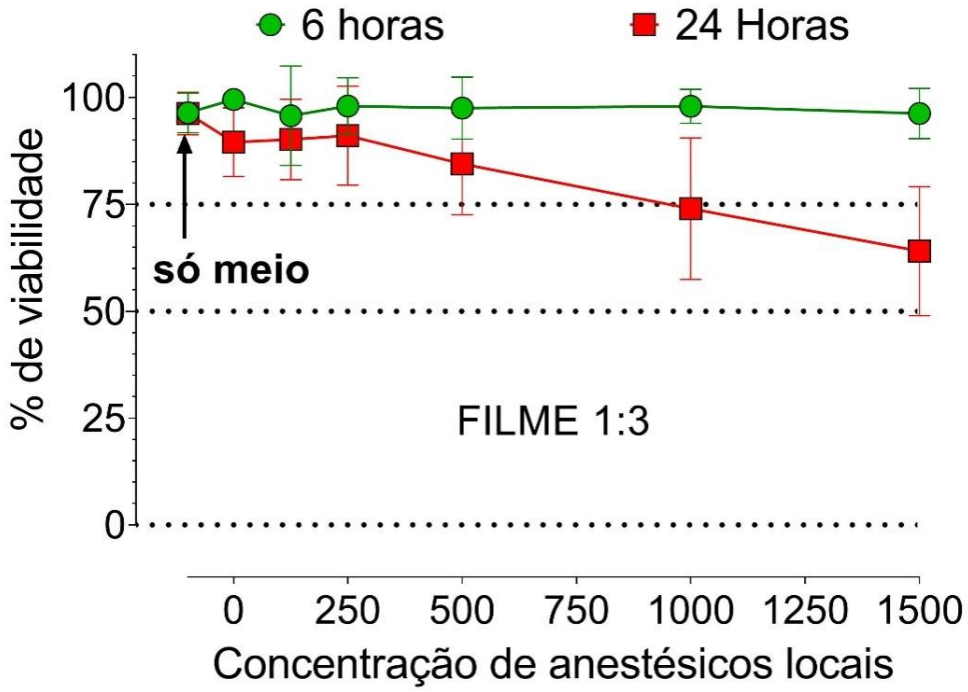


Gráfico 2. Viabilidade celular do filme nas proporções poliméricas 1:3 (AH/ALG) e suas diferentes concentrações anestésicas.

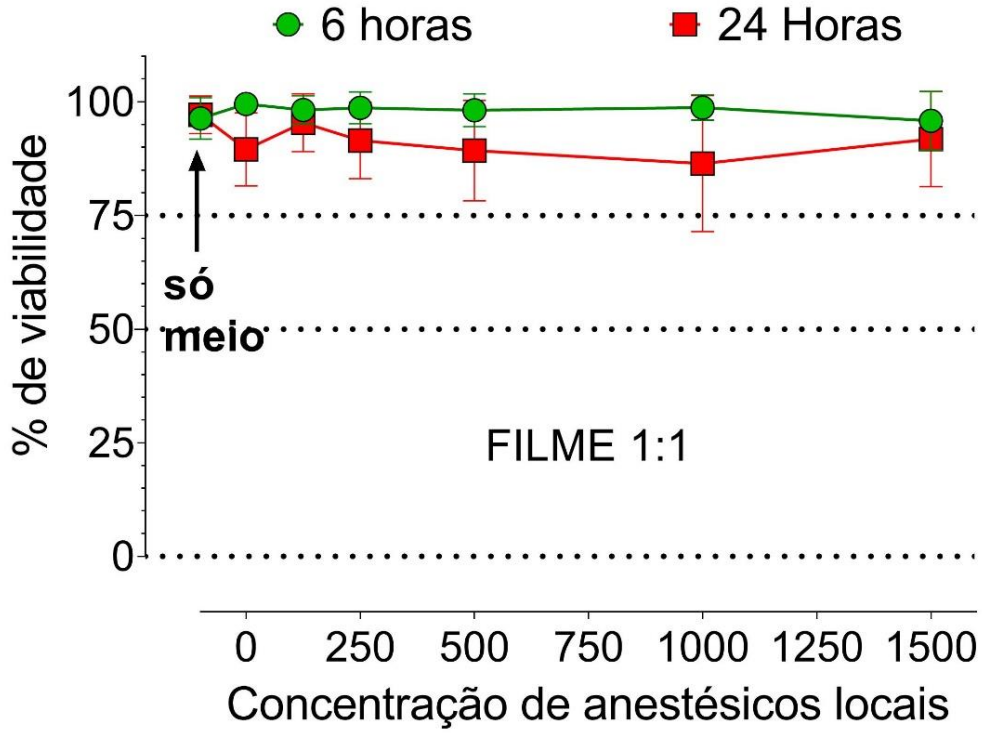


Gráfico 3. Viabilidade celular do filme nas proporções poliméricas 1:1 (AH/ALG) e suas diferentes concentrações anestésicas.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente estudo, optamos por testar filmes compostos com alginato e ácido hialurônico (AH) devido às boas propriedades desses dois compostos, visando a futura aplicabilidade do filme com anestésicos locais sobre feridas e pele integra. Uma das primeiras etapas para observar essa possível aplicabilidade é, de fato, verificar a citotoxicidade dos compostos sobre células. Esse modelo de estudo in vitro, empregado nesta pesquisa, tem sido muito relatado na literatura para este fim. Diferentes células, tais como fibroblastos, adipócitos, condrócitos, neurônios, células epiteliais (Keck et al., 2010; Birkenmaier et al., 2011; Schonfeld-Dado et al., 2009; Lang et al., 2010) entre outras células, vêm sendo estudadas, apesar das desvantagens e limitações deste método. Embora a dificuldade em relacionar diretamente os resultados in vitro com estudos in vivo, da possível instabilidade das células em cultura e da perda de duas características fenotípicas sejam relatados como desvantagens, o modelo se firmou como um dos principais métodos iniciais para observar o efeito de fármacos em nível celular (Mena et al., 2010).

As células epiteliais são constantemente submetidas aos anestésicos locais (AL) em vários procedimentos médicos e odontológicos, expondo essas células ao contato com concentrações variadas de ALs. A linhagem de queratinócitos humanos imortalizados espontaneamente (HaCaT) foi escolhida, pois se constitui um modelo experimental já bem definido para explorar a resposta celular sobre diferentes contextos, que justificam seu amplo emprego em estudos in vitro para investigação de vias de sinalização intracelulares e respostas a diferentes tipos de estresse (Boukamp et al., 1988; Ravid et al., 2002).

As concentrações de anestésicos locais utilizadas no presente estudo representam valores muito superiores às concentrações plasmáticas observadas na prática clínica (Downing et al., 1997), mas idênticos aqueles de primeira exposição, ou seja, quando há o contato inicial e direto com o fármaco. Assim, as concentrações usadas in vitro nesse estudo foram muito superiores àquelas que se manteriam na pele integra, constituindo-se num desafio muito maior que em situações in vivo. Ainda assim foi possível observar que as células toleraram bem essas concentrações e por períodos significativamente maiores a que seriam submetidas in vivo (24 horas).

Essa boa compatibilidade observada com os filmes é diretamente ligada aos compostos utilizados. O primeiro composto, o alginato, é um polissacarídeo aniônico

composto por 1,4 ácido beta-d-manurônico e monômeros de ácido alfa-l-gulurônico derivados de algas marinhas. Interagindo com cátions divalentes, as cadeias de alginato podem ser polimerizadas para formar ligação iônica intercadeias (Hunziker, 2002).

Dausse et al. (2003) relatam que o alginato aumentou a produção de IL-1 por monócitos e que, mesmo sendo considerado como um polímero totalmente biocompatível, seus resíduos de ácido manuronico poderiam estimular citocinas, especialmente a IL-1, a qual poderia ativar a produção de ácido hialurônico em cartilagens quando estimuladas pela cicloxigenase. Isso justifica a sua não utilização isolada. Já o ácido hialurônico (AH) e seus sais estão entre os polímeros naturais mais atrativos para aplicação em defeitos em cartilagens. O AH é composto de dois dissacarídeos (N-acetil-d-glucosamina e ácido beta-glucoronico) que se repetem (Son et al., 2013). Forma uma cadeia polissacarídica natural não ramificada e é um ingrediente importante da matriz extracelular da cartilagem.

Além disso, desempenha vários papeis na proliferação celular, morfogênese, na inflamação e no reparo de feridas (Chen et al., 2018). Suas vantagens sobre outros polímeros, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de imunogenicidade e viscoelasticidade, são muito conhecidas e já testadas. Entretanto, algumas de suas propriedades físico-químicas ainda precisam de aprimoramento, como sua alta degradabilidade, seu rápido clearence e reações hidrolíticas (Son et al., 2013). Assim, a utilização de ambos conjuntamente poderia ser benéfica. De fato, o ácido hialurônico é reconhecido por melhorar a biocompatibilidade de muitos materiais.

Contrariamente aos compostos de alginato, os hidrogéis baseados somente no ácido hialurônico não causam estimulação de citocinas, sendo, na verdade, inibidor da produção de IL-1 (Dausse et al., 2003). Embora no presente estudo nenhuma citocina tenha sido medida, foi possível observar que o filme com maior proporção de alginato realmente foi mais tóxico para a célula, particularmente quando estas eram expostas ao período de 24 horas.

Para melhorar suas propriedades, o AH tem sido complexado com outras substâncias. De fato, a mistura com o alginato não é nova na literatura e daí a opção de complexar o AH com este composto no presente estudo. Estruturas a base de alginato e AH têm sido utilizadas como arcabouço para crescimento e proliferação celular mostrando grande potencial devido às propriedades já descritas. O polímero

composto por AH e alginato foi apontado como um arcabouço promissor para o reparo de defeitos subcondrais (Chen et al., 2018).

A utilização dessas substâncias para drug delivery (Zhang et al., 2019), incluindo aplicação para cavidade oral (Angela Baus et al., 2019), vem sendo descrita na literatura. De particular interesse, muitas aplicações visam a aplicação de drogas variadas com potencial terapêutica para pele lesada ou integra, na forma de curativos (Rossi et al., 2018; Tarusha et al., 2018). Além do nosso estudo, apenas um outro (Albertini et al., 2013) mostrou a utilidade do alginato como drug delivery para a lidocaína, mas era associado à quitosana e não ao AH.

Assim, os resultados obtidos no nosso estudo podem ser considerados promissores para entender a biocompatibilidade do polímero na forma de filme associado aos anestésicos locais. Pela resposta celular verificada aqui, podemos concluir que os filmes se mostraram com toxicidade aceitável para futura utilização, embora outros ensaios ainda sejam necessários.

REFERÊNCIAS

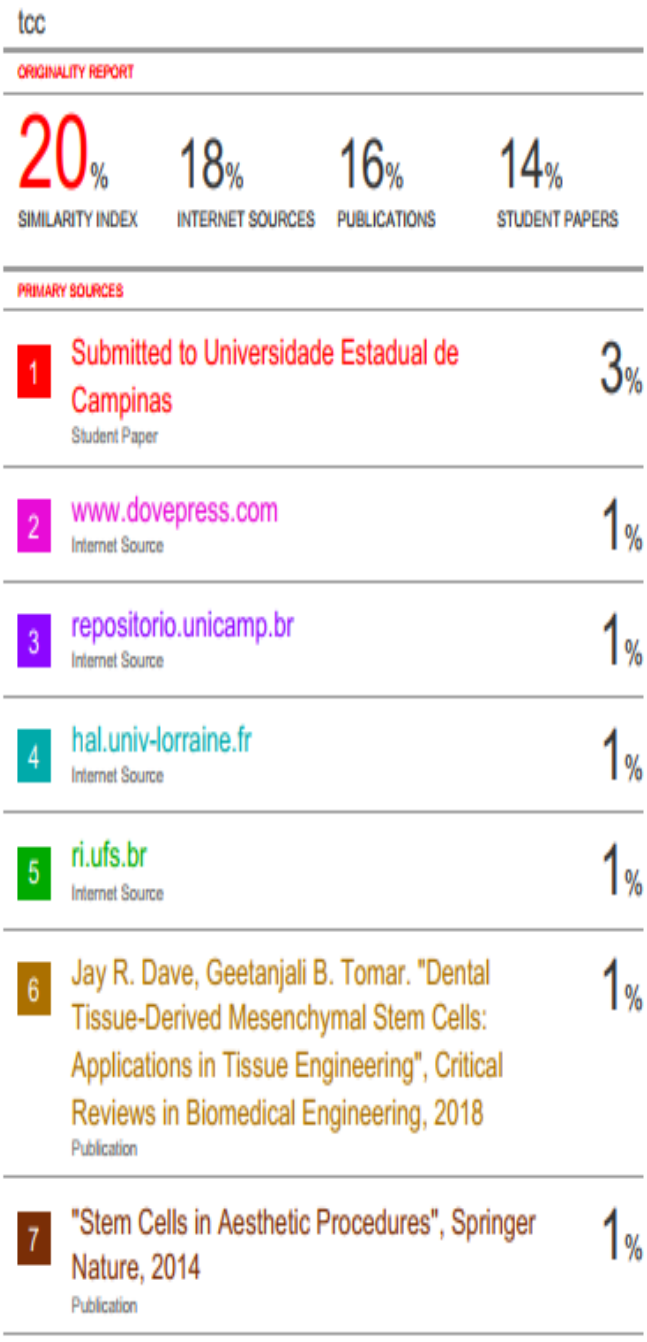
1. Albertini B, Di Sabatino M, Calonghi N, Rodriguez L, Passerini N. Novel multifunctional platforms for potential treatment of cutaneous wounds: development and in vitro characterization. Int J Pharm. 2013 Jan 20;440(2):238-49.
2. Angela Baus R, Zahir-Jouzdani F, Dünnhaupt S, Atyabi F, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery: In vitro- in vivo correlation study. Eur J Pharm Biopharm. 2019 Jul 19.
3. Ansari S, Diniz IM, Chen C, Sarrion P, Tamayol A, Wu BM, Moshaverinia A. Human Periodontal Ligament- and Gingiva-derived Mesenchymal Stem Cells Promote Nerve Regeneration When Encapsulated in Alginate/Hyaluronic Acid 3D Scaffold. Adv Healthc Mater. 2017 Dec;6(24).
4. Birkenmaier C, Redeker J, Sievers B, Melcher C, Jansson V, Mayer-Wagner S. An evaluation of medications commonly used for epidural neurolysis procedures in a human fibroblast cell culture model. Reg Anesth Pain Med. 2011;36(2):140-4.
5. Burke SE, Barrett CJ. pH-responsive properties of multilayered poly (L-lysine)/ hyaluronic acid surfaces. Biomacromolecules. 2003;4(6):1773-83.
6. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatorypropertiesof local anesthetics and theirpresent and potentialclinicalimplications. Acta AnaesthesiolScand. 2006;50(3):265-82.
7. Chen P, Xia C, Mo J, Mei S, Lin X, Fan S. Interpenetrating polymer network scaffold of sodium hyaluronate and sodium alginate combined with berberine for osteochondral defect regeneration. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2018 Oct 1;91:190-200.
8. Dausse Y, Grossin L, Miralles G, Pelletier S, Mainard D, Hubert P, Baptiste D, Gillet P, Dellacherie E, Netter P, Payan E. Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect. Osteoarthritis Cartilage. 2003 Jan;11(1):16-28.
9. Downing JW, Johnson HV, Gonzalez HF et al. The pharmacokinetics of epidural lidocaine and bupivacaine during cesarean section. Anesth Analg. 1997; 84: 527–32.
10. Franz-Montan M, de Paula E, Groppo FC, Silva ALR, Ranali J, Volpato MC. Liposomaldeliverysystemfortopicalanaesthesiaofthe palatal mucosa. Br J Oral MaxillofacSurg. 2012;50(1):60–4.

11. Franz-Montan M, Ranali J, Ramacciato JC, de Andrade ED, Volpato MC, Groppo FC. Ulcerationof gingival mucosa aftertopicalapplicationof EMLA: reportoffour cases. Br Dent J. 2008;204(3):133-4.
12. Franz-Montan M, Ribeiro LN, Volpato MC, Cereda CM, Groppo FC, Tofoli GR, de Araújo DR, Santi P, Padula C, de Paula E. Recentadvances and perspectives in topical oral anesthesia. ExpertOpinDrugDeliv. 2016;1:1-12.
13. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis Cartilage. 2002 Jun;10(6):432-63.
14. Hutmacher DW, Goh JC, Teoh SH. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. Ann Acad Med Singapore. 2001 Mar;30(2):183-91
15. Jain & Bar-Shalom, 2014
16. Keck M, Zeyda M, Gollinger K, Burjak S, Kamolz LP, Frey M, Stulnig TM. Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation into adipocytes. Plast. Reconstr. Surg 2010;126(5):1500-5.
17. Lang A, Ben Horin S, Picard O, Fudim E, Amariglio N, Chowers Y. Lidocaine inhibits epithelial chemokine secretion via inhibition of nuclear factor kappa B activation. Immunobiology 2010;215(4):304-13.
18. Meechan JG, Donaldson D. The intraoral use of EMLA cream in children: a clinical investigation. ASDC J Dent Child. 1994;61(4):260–2.
19. Meechan JG, Howlett PC, Smith BD. Factors Influencing the Discomfort of Intraoral Needle Penetration. Anesth Prog. 2005;52(3):91–4.
20. Mena MA, Perucho J, Rubio I, de Yébenes JG. Studies in animal models of the effects of anesthetics on behavior, biochemistry, and neuronal cell death. J Alzheimers Dis. 2010;22(3):43-8.
21. Picart C, Lavalle P, Hubert P, Cuisinier FJG, Decher G, Schaaf P, et al. Buildup Mechanism for Poly(l -lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface. Langmuir. 2001;17(23):7414–24.
22. Picart C, Mutterer J, Richert L, Luo Y, Prestwich GD, Schaaf P, et al. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(20):12531–5.
23. Oliveira I, Carvalho AL, Radhouani H, Gonçalves C, Oliveira JM, Reis RL. Promising Biomolecules. Adv Exp Med Biol. 2018;1059:189-205.

24. Rajaram A, Schreyer DJ, Chen DX. Use of the polycation polyethyleneimine to improve the physical properties of alginate-hyaluronic acid hydrogel during fabrication of tissue repair scaffolds. J Biomater Sci Polym Ed. 2015;26(7):433-45.
25. Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. J Cell Physiol. 2002 Jan;190(1):7-20.
26. Rossi S1, Mori M2, Vigani B2, Bonferoni MC2, Sandri G2, Riva F3, Caramella C2, Ferrari F2. A novel dressing for the combined delivery of platelet lysate and vancomycin hydrochloride to chronic skin ulcers: Hyaluronic acid particles in alginate matrices. Eur J Pharm Sci. 2018 Jun 15;118:87-95.
27. Schonfeld-Dado E, Segal M. Activity-dependent survival of neurons in culture: a model of slow neurodegeneration. J Neural Transm 2009;116(11):1363-9.
28. Son YJ, Yoon IS, Sung JH, Cho HJ, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. Porous hyaluronic acid/sodium alginate composite scaffolds for human adipose-derived stem cells delivery. Int J Biol Macromol. 2013 Oct;61:175-81.
29. Tarusha L1, Paoletti S1, Travan A1, Marsich E2. Alginate membranes loaded with hyaluronic acid and silver nanoparticles to foster tissue healing and to control bacterial contamination of non-healing wounds. J Mater Sci Mater Med. 2018 Feb 2;29(3):22.
30. Zhang Y1, Li X1, Zhong N1, Huang Y1, He K1, Ye X1. Injectable in situ dual-crosslinking hyaluronic acid and sodium alginate based hydrogels for drug release. J Biomater Sci Polym Ed. 2019 Aug;30(12):995-1007.

ANEXOS

Anexo 1 - Verificação de originalidade e prevenção de plágio



tcc

ORIGINALITY REPORT

20%	18%	16%	14%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Student Paper	3%
2	www.dovepress.com Internet Source	1%
3	repositorio.unicamp.br Internet Source	1%
4	hal.univ-lorraine.fr Internet Source	1%
5	ri.ufs.br Internet Source	1%
6	Jay R. Dave, Geetanjali B. Tomar. "Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering", Critical Reviews in Biomedical Engineering, 2018 Publication	1%
7	"Stem Cells in Aesthetic Procedures", Springer Nature, 2014 Publication	1%

Anexo 2 - Iniciação científica

Relatório Final

Período de envio do Relatório Final: 01/08/2018 - 13/08/2018

Versão enviada em 10/08/2018 13:20:54 ver relatório

— **Parecer do orientador emitido em 12/08/2018 19:04:01**

— **Parecer do Assessor dado em 18/09/2018 22:25:58**
(O parecer a respeito de seu relatório está disponível ao orientador responsável)
● Aprovado