



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

RONIERY DE OLIVEIRA COSTA

DESENVOLVIMENTO DE UM ANESTÉSICO E ANALGÉSICO TÓPICO BUCAL
COM EXTRATO DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart

CAMPINA GRANDE

2018

RONIERY DE OLIVEIRA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE UM ANESTÉSICO E ANALGÉSICO TÓPICO BUCAL
COM EXTRATO DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros

CAMPINA GRANDE

2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C837d Costa, Roniery de Oliveira.
Desenvolvimento de um anestésico e analgésico tópico bucal com extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart [manuscrito] / Roniery de Oliveira Costa. - 2018.
82 p. : il. colorido.

Digitado.
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.
"Orientação : Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Técnicas Analíticas. 2. Dor Orofacial. 3. Anestesia local.
4. *Aspidosperma*. 5. Análise térmica. I. Título

21. ed. CDD 615.321

RONIERY DE OLIVEIRA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE UM ANESTÉSICO E ANALGÉSICO TÓPICO BUCAL
COM EXTRATO DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em 30/07/2018

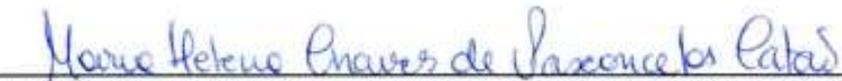
BANCA EXAMINADORA



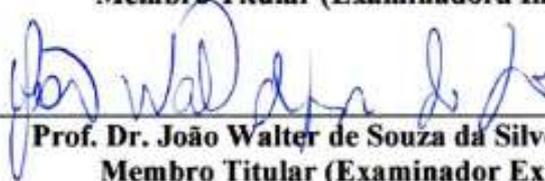
Prof.ª. Dr.ª. Ana Cláudia Dantas de Medeiros
Membro Titular (Orientadora)



Prof.ª. Dr.ª. Vanda Lúcia dos Santos /UEPB
Membro Titular (Examinadora Interna)



Prof.ª. Dr.ª. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão/UEPB
Membro Titular (Examinadora Interna)



Prof. Dr. João Walter de Souza da Silveira /UEPB
Membro Titular (Examinador Externo)



Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes /UNIFACISA
Membro Titular (Examinador Externo)

A meu pai, *in memoriam*, que faleceu durante o 2º ano do doutorado, por todo apoio, conselhos e por ter sido um referencial na minha formação. Minha Eterna Gratidão!!

Dedico.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha orientadora **Profa Ana Cláudia Dantas de Medeiros** agradeço a oportunidade de partilhar do seu conhecimento e experiência, sempre presente, apesar de tantos compromissos. Em nenhum momento você deixou de acreditar no meu potencial, me ensinou que os desafios podem ser superados e me fez enxergar cada dificuldade como uma ocasião de crescimento. Sua confiança, amizade e apoio foram imprescindíveis. Meu sincero respeito e admiração!

Ao **Prof. Dr. João Walter de Souza da Silveira** pelas contribuições nos ensaios farmacológicos desta pesquisa, por tamanha dedicação e empenho em contribuir em cada etapa, pela agradável companhia e amizade. Sou grato pelo privilégio de ter acompanhado um profissional dedicado à pesquisa científica e comprometido com o ensino e com a ética. Seu bom humor e tranquilidade fizeram com que tudo parecesse mais fácil, obrigado por me acolher e pelos ensinamentos. Seu auxílio foi indispensável no engrandecimento desta pesquisa. Meu sincero agradecimento!

A **Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos** pelas contribuições precisas e sábias, pela solicitude com que sempre atendeu cada uma das minhas dúvidas, quer pessoalmente ou à distância. Agradeço enormemente suas contribuições, seu auxílio foi indispensável ao término desta pesquisa em tempo hábil. Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte inesgotável, por estar sempre comigo em todos os momentos, dando-me força para mais essa conquista e sabedoria para lidar com as adversidades.

À minha esposa, Ivna Rafaela, que sempre esteve comigo nas horas que mais precisei. Por mostrar que duas pessoas podem ser um só pensamento, que duas vidas podem estar em só momento e que dois sonhos podem triunfar por um só caminho. Te amo!

Aos meus pais, Assis (*in memorian*) e Lúcia, pelo amor incondicional, pelo carinho e dedicação nos momentos difíceis, sendo “peças” fundamentais na minha formação acadêmica por sempre acreditarem nos filhos e por mostrarem que os sonhos não têm idade e que somos capazes de realizá-los. Amo Vocês!

Aos meus irmãos, Rosemberg, Rodolpho e Raíssa, pelo carinho, confiança e dedicação, durante esse trajeto.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) pela minha formação na graduação e pós-graduação.

À Faculdade de Enfermagem e de Medicina Nova Esperança (FACENE/FAMENE) pela parceria estabelecida e pela oportunidade de utilizar o Biotério para realização dos ensaios farmacológicos.

À Universidade Federal de Campina Grande, através do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, pela parceria firmada com a doutora Isabel Rabello.

Ao prof. Dr. João Vinícius Barbosa Roberto, médico veterinário da FACENE/FAMENE, pela parceria estabelecida, agradável companhia e amizade e ao **técnico do biotério, Edvaldo**, pela colaboração durante o experimento com os animais.

À APEL – Aplicações Eletrônicas, coordenado pelo engenheiro elétrico Luiz Geraldo Régis, pelo desenvolvimento dos equipamentos eletrônicos utilizados no teste operante comportamental térmico.

A todos os **professores da pós-graduação** pelos ensinamentos e disponibilidade em atender cada dúvida, cada questionamento, sobretudo pelo incentivo em cada etapa do mestrado.

Aos colegas de turma **Andreia Medeiros, Monalisa Cesarino, Maraysa Alves, Maria Betânia e Rennaly Lima** por todos os momentos compartilhados.

À Cleido Santana, Fernando José, Hilthon Alves e Jocimar Santos, integrantes do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos da UEPB, pelo auxílio no estudo de pré-formulação do gel desenvolvido. **À Raiff dos Santos Dantas**, aluno do curso de farmácia da UEPB e **à Raissa de Oliveira Costa**, aluna do curso de Odontologia da UEPB, pelo auxílio no teste da avaliação da atividade motora em camundongos.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito Obrigado!

“A vitória pertence aos perseverantes”

Napoleão Bonaparte

RESUMO

Aspidosperma pyriforme Mart é uma planta nativa da caatinga nordestina que apresenta propriedades farmacológicas com ênfase nos efeitos analgésicos e anestésicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um gel anestésico e analgésico tópico bucal com *Aspidosperma pyriforme* Mart. As cascas desta planta foram coletadas no Distrito de São José da Mata, Campina Grande-PB. O material vegetal coletado foi seco em estufa de ventilação forçada à temperatura constante, em seguida submetida à extração por turbólise e seco em *Spray Dryer*, utilizado Aerosil® 200, como adjuvante farmacotécnico. As misturas binárias entre o extrato e os excipientes bicarbonato de sódio, carbopol, carboximetilcelulose, glicerina, hidróxido de cálcio, hidroetilcelulose, propilenoglicol, sorbitol e trietanolamina, foram avaliadas por análise térmica, difração de raios-X e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier. No estudo de compatibilidade, apenas o bicarbonato de sódio apresentou incompatibilidade química com o extrato. O gel desenvolvido de *Aspidosperma pyriforme* Mart foi produzido com os seguintes excipientes: carbopol (espessante), trietanolamina (alcalinizante) e propilenoglicol (umectante). Nos ensaios farmacológicos foram utilizados camundongos machos swiss, com peso entre 25 e 35 gramas, aleatoriamente divididos em quatro ensaios farmacológicos, avaliação da atividade motora (Rota-rod), teste da formalina orofacial, teste térmico operante de avaliação da dor orofacial e bloqueio do nervo ciático. Utilizaram 5 grupos experimentais: controle negativo (apenas excipientes farmacêuticos), benzocaína a 20% (controle positivo) e os géis de *A. pyriforme* com 62,5, 125 e 250 mg/kg, com exceção do último ensaio, que avaliou a atividade anestésica do extrato no nervo ciático em 62,5, 31,25, 15,62 e 7,81mg/mL, além dos controles negativos e positivos, solução fisiológica e lidocaína (5mg/mL), respectivamente. Foi avaliado também a atividade motora do camundongo, utilizando do extrato por 250mg/kg via oral, além dos ensaios da formalina orofacial e do teste térmico operante de avaliação da dor orofacial. O extrato e géis de *A. pyriforme* não alteraram a atividade motora do camundongo. Os tratamentos de 62,5, 125 e 250 mg/kg inibiram significativamente a dor no lábio esquerdo do camundongo comparado a benzocaína 20% em 5 ($p < 0,01$) e entre 15 e 40 minutos após administração da formalina orofacial ($p < 0,001$). O extrato em 62,5 mg/kg apresentou atividade anestésica significativa em relação a 31,25, 15,62, 7,81mg/mL, salina fisiológica e lidocaína 5mg/mL ($p < 0,001$). Os géis de *A. pyriforme* apresentaram excelente atividade antinociceptiva em 125mg/kg comparado a benzocaína 20% em 1 ($p < 0,01$), 5 ($p < 0,001$) e 10 ($p < 0,05$) minutos após a inserção do animal na gaiola de acrílico e, em 1 ($p < 0,01$) e 5 ($p < 0,01$) minutos com 250mg/kg comparado ao

controle negativo. Portanto, o extrato de APM apresentou uma excelente atividade anestésica no nervo ciático do camundongo na proporção de 62,5mg/kg, quando comparado a lidocaína (5mg/mL). O gel desenvolvido de *A. pyrifolium* apresentou um ótimo efeito antinociceptivo, decorrentes da sua ação anestésicas e analgésicas, principalmente nas proporções de 125 e 250mg/kg, que podem favorecer sua utilização na clínica odontológica.

Palavras-Chaves: *Aspidospermas*. Análise térmica. Técnicas Analíticas. Dor Orofacial. Anestesia Local. Anestesia e Analgesia.

ABSTRACT

Aspidosperma pyrifolium Mart is a plant native to the northeastern caatinga that presents pharmacological properties with emphasis on the analgesic and anesthetic effects. The objective of this work was to develop an anesthetic gel and buccal topical analgesic with *Aspidosperma pyrifolium* Mart. The bark of this plant was collected in the District of São José da Mata, Campina Grande-PB. The collected vegetal material was dried in forced ventilation oven at constant temperature, then subjected to the turbolysis and dried in *Spray Dryer*, used Aerosil® 200, as a pharmacotechnical adjuvant. Binary mixtures between the plant extract and the excipients sodium bicarbonate, carbopol, carboxymethylcellulose, glycerol, calcium hydroxide, hydroethylcellulose, propylene glycol, sorbitol and triethanolamine were evaluated by thermal analysis, X-ray diffraction and infrared spectroscopy with Fourier transform. In the compatibility study, only sodium bicarbonate presented chemical incompatibility with the extract. The gel developed from *Aspidosperma pyrifolium* Mart used carbopol (thickener), triethanolamine (alkalizing) and propylene glycol (humectant). In the pharmacological tests, 143 swiss male mice, weighing between 25 and 35 grams, were randomly divided into four pharmacological tests, motor activity evaluation (Rota-rod), orofacial formalin test, orofacial pain evaluation and blocking of the sciatic nerve. They used 5 experimental groups: negative control (pharmaceutical excipients only), 20% benzocaine (positive control) and *A. pyrifolium* gels with 62.5, 125 and 250 mg / kg, except for the last assay, which evaluated the activity anesthesia of the sciatic nerve extract in 62.5, 31.25, 15,62 and 7,81mg / mL, in addition to the negative and positive controls, physiological solution and lidocaine (5mg / mL), respectively. It was also evaluated the motor activity of the mouse, using the extract by 250mg / kg oral, in addition to the tests of the orofacial formalin and the thermal test operative of evaluation of orofacial pain. The extracts and gels of *A. pyrifolium* did not alter the motor activity of the mouse. The treatments of 62.5, 125 and 250 mg / kg significantly inhibited left mouse lip pain compared to benzocaine 20% in 5 (p <0.01) and 15-40 minutes after administration of orofacial formalin (p < 0.001). The extract at 62.5 mg / kg presented significant anesthetic activity in relation to 31.25, 15,62, 7,81mg / mL, physiological saline and 5mg / mL lidocaine (p <0.001). *A. pyrifolium* gels presented excellent antinociceptive activity at 125mg / kg compared to benzocaine 20% at 1 (p <0.01), 5 (p <0.001) and 10 (p <0.05) minutes after the animal insertion in the acrylic cage and in 1 (p <0.01) and 5 (p <0.01) minutes with 250 mg / kg compared to the negative control. Therefore, the extract of APM presented an excellent anesthetic activity

in the sciatic nerve of the mouse in the proportion of 62.5 mg / kg when compared to lidocaine (5mg / mL). The developed gel of *A. pyrifolium* presented an excellent antinociceptive effect, due to its anesthetic and analgesic action, mainly in the proportions of 125 and 250mg / kg, which may favor its use in the dental clinic.

Key-words: *Aspidospermas*. Thermal analysis. Analytical Techniques. Orofacial Pain. Local anesthesia. Anesthesia and Analgesia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	<i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart. popularmente conhecido como “pereiro”....	26
Figura 2	DTG-60 Simultaneous DTA-TG Apparatus, Shimadzu, São Paulo-SP, Brasil	28
Figura 3	Difratomer XRD 6100, Shimadzu, São Paulo- SP,Brasil.....	29
Figura 4	Aparelho Perkin-Elmer modelo 1600, Spectralab, Scientific Incorporation, Canadá	29
Figura 5	Fluxograma dos grupos de tratamento e número de animais no teste da formalina orofacial.....	32
Figura 6	Teste da formalina orofacial com aplicação tópica dos grupos CTRL, CTRP, T62,5, T125 e T250 no lábio superior esquerdo do camundongo (a). Aplicação da injeção subcutânea de formalina (20 µl, 2%) no lábio superior esquerdo do animal (b). Os animais observados individualmente em funis de vidro com espelhos posicionados posteriormente de forma a permite uma visão da geral de cada camundongo (c). Os animais esfregando a região orofacial com a pata ipsilateral anterior e/ou posterior (d).....	32
Figura 7	Fluxograma dos grupos de tratamento e número de animais no teste da avaliação da atividade motora (Rota-rod).....	34
Figura 8	O teste do Rota-rod (Insight, São Paulo-SP) com rotação de 20 rpm na barra giratória (a), com camundongos tratados por via oral (10mL/Kg) com a maior concentração (250mg/Kg) do EHAPM diluído em salina fisiológica, grupo EHAPM250 (b).....	34
Figura 9	Fluxograma dos grupos de tratamento e número de animais no teste do Bloqueio do nervo ciático.....	36
Figura 10	Animais com capacidade de andar normalmente na tela metálica (fio 1 mm de diâmetro, malha de 5mm) invertida, usando os quatro membros (a). Administração dos tratamentos dos grupos CTRAP, CTRLN, EHAPM 62,5, EHAPM 31,25, EHAPM 10,4, EHAPM 3,46, na região da fossa poplítea da pata posterior esquerda (na região do nervo ciático) usando uma agulha de	

	calibre 27G (b) . Efeito anestésico de alguns tratamentos, detectado pela incapaz de usar o membro injetado para escalar a tela metálica (c) . Câmera de vídeo (Sony® AVCHD) utilizada no ensaio farmacológico (d)	36
Figura 11	Fluxograma dos grupos de tratamento e número de animais utilizando Teste térmico operante de avaliação da dor orofacial.....	38
Figura 12	Caixa de acrílico (20 cm ² x 20 cm ² x 16 cm ²) com uma abertura de 2cm ² em uma das paredes com tubo de metal (cobre) interligado a um dispositivo que transforma eletricidade em calor (a) . Amperímetro digital DT266 utilizado no controle de temperatura do experimento (b) . O animal obrigatoriamente encostar a região orofacial no tubo de metal aquecido para acesso garrafa padrão de água para camundongos (c) . Tricotomia da região orofacial dos animais, área de inervação dos nervos maxilar e mandibular (nervo trigêmeo) (d)	38
Artigo 1		
Figura 1	Curva DTA do extrato de <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.....	44
Figura 2	Curvas de DTA do extrato de APM, excipientes e misturas binárias (a) bicarbonato de sódio, (b) carbopol, (c) carboximetilcelulose, (d) glicerina, (e) hidróxido de cálcio, (f) hidroxietilcelulose, (g) propilenoglicol, (h) sorbitol, (i) trietanolamina.....	46
Tabela 1	Dados das curvas DTA referentes às etapas de decomposição do extrato APM, excipientes farmacêuticos e misturas binárias.....	47
Figura 3	Curvas de Difração de Raios-X do extrato e suas misturas binárias: (a) APM (b) bicarbonato de Sódio, (c) carboximetilcelulose, (d) glicerina, (e) hidróxido de cálcio, (f) propilenoglicol, (g) sorbitol e (h) trietanolamina.....	49
Figura 4	Espectros do IF-IR do extrato com as misturas binárias: (a) bicarbonato de Sódio, (b) carboximetilcelulose, (c) glicerina, (d) hidróxido de cálcio, (e) propilenoglicol, (f) sorbitol e (g) trietanolamina.....	52
Artigo 2		

Figura 1	Aplicação dos tratamentos dos grupos CTRAP, CTRLN, EHAPM62,5, EHAPM31,25, EHAPM15,62 e EHAPM7,81 no nervo ciático do camundongo (a) com anestesia da pata esquerda (b).....	62
Figura 2	Teste térmico operante de avaliação da dor orofacial realizado em caixa de acrílico interligado a um dispositivo que transforma eletricidade em calor (a). Amperímetro digital DT266 utilizado no controle de temperatura do experimento (b). Contato da região orofacial do camundongo com o tubo de metal aquecido para acesso garrafa padrão de água (c). Tricotomia da região orofacial dos animais, área de inervação dos nervos maxilar e mandibular (nervo trigêmeo) (d).....	63
Figura 3	Tempo de fricção da região orofacial (s) entre 0 a 5 minutos (a) e entre 15 a 40 minutos (b) após a administração da formalina orofacial.....	64
Figura 4	Tempo (s) de permanência no Rota-rod até a primeira queda do animal.....	65
Figura 5	Tempo de Bloqueio do nervo ciático (min) em camundongos.....	66
Figura 6	Tempo de sucção dos camundongos nos grupos CTRL, CTRP, T62,5, T125 e T250 nos tempos de 1 (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e), 25 (f) e 30 (g) minutos após a inserção do animal na caixa de acrílico.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
g	Gramma
kg	Quilo
mg	Miligramma
mL	Mililitros
p	Nível de significância
s	Segundos
min	Minutos

LISTA DE SIGLAS

ALs	Anestésico local
AT	Anestésico tópico
APM	<i>Aspidosperma Pyrifolium</i> Mart
CTRL	Gel desenvolvido com apenas excipientes farmacêuticos (controle negativo)
CTRP	Benzocaina a 20%, Benzotop 200mg/g (controle positivo)
CTRLN	Salina fisiológica (controle negativo)
CTRAP	Lidocaína 5mg/mL (controle positivo)
EHAPM	Extrato hidroetanólico das cascas de <i>Aspidosperma Pyrifolium</i> Mart
EHAPM62,5	Extrato hidroetanólico das cascas de <i>Aspidosperma Pyrifolium</i> Mart na concentração de 62,5mg/mL em salina fisiológica
EHAPM31,25	Extrato hidroetanólico das cascas de <i>Aspidosperma Pyrifolium</i> Mart na concentração de 31,25mg/mL em salina fisiológica
EHAPM15,62	Extrato hidroetanólico das cascas de <i>Aspidosperma Pyrifolium</i> Mart na concentração de 15,62mg/mL em salina fisiológica
EHAPM7,81	Extrato hidroetanólico das cascas de <i>Aspidosperma Pyrifolium</i> Mart na concentração de 7,81mg/mL em salina fisiológica
F62,5	Gel de <i>Aspidosperma Pyrifolium</i> Mart na proporção de 62,5mg/kg
F125	Gel de <i>Aspidosperma Pyrifolium</i> Mart na proporção de 125mg/kg
F250	Gel de <i>Aspidosperma Pyrifolium</i> Mart na proporção de 250mg/kg
pH	Potencial hidrogeniônico

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
°C	Grau celsius
=	Igual
%	Por cento
<	Menor
±	Desvio padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivo Especifico	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Obtenção do material vegetal	26
3.2	Obtenção do extrato	26
3.3	Estudos de compatibilidade extrato-excipientes farmacêuticos	27
3.3.1	<i>Obtenção das misturas binárias</i>	27
3.4	Análise do comportamento térmico do extrato e das misturas binárias	28
3.4.1	<i>Análise térmica diferencial (DTA)</i>	28
3.4.2	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i>	28
3.4.3	<i>Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FR-IR)</i>	29
3.5	Desenvolvimento do gel de <i>Aspidosperma Pyrifolium Mart</i>	29
3.6	Investigação da atividade farmacológica	30
3.6.1	<i>Caracterização do estudo farmacológico</i>	30
3.6.2	<i>Aspectos Éticos</i>	30
3.6.3	<i>Amostra</i>	30
3.6.3.1	<i>Critérios de inclusão e exclusão da amostra</i>	30
3.6.4	<i>Ensaio Farmacológicos</i>	31
3.6.4.1	<i>Teste da Formalina orofacial</i>	31
3.6.4.2	<i>Teste da avaliação da atividade motora (Rota-rod)</i>	33
3.6.4.3	<i>Bloqueio do nervo ciático</i>	34
3.6.4.4	<i>Teste térmico operante de avaliação da dor orofacial</i>	37
3.7	Eutanásia dos animais	39
3.8	Análise estatística	39
4	ARTIGOS A SEREM SUBMETIDOS	40
4.1	Artigo 1	41
4.2	Artigo 2	57

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO A Certidão.....	83

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem a maior biodiversidade vegetal do mundo (OLIVEIRA et al., 2018), com flora estimada entre 50.000 a 60.000 espécies, o que contribui para o amplo uso de plantas para fins medicinais (TRZECIAK et al., 2008), no qual o conhecimento popular é de extrema importância para a investigação farmacológica, tornando o Brasil um fonte de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos (NETO et al., 2014).

Caatinga é o principal bioma do semiárido brasileiro que constitui um rico ecossistema exclusivamente brasileiro, com grande diversidade de espécies e elevada incidência de plantas endêmicas (FORZZA et al., 2012). No entanto, existem poucos estudos científicos sobre os efeitos farmacológicos das plantas medicinais desse bioma (Cartaxo et al., 2010), que são conhecidas pelo conhecimento popular em doenças cutâneas, gastrointestinais e infecções do trato urinário (Agra et al., 2007a, b).

Em regiões de domínio da Caatinga, observa-se espécies vegetais como a *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira), indicada no combate a problemas do aparelho respiratório, anti-inflamatório e cicatrizante; *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Angico), no tratamento de doenças do aparelho respiratório, *Poincianella pyramidalys* (Tul.) L. P. Queiroz (Catingueira), empregada em problemas gastrointestinais, problemas do aparelho respiratório e geniturinário (SILVA, FREIRE, 2010; MARINHO et al., 2011; CHAVES et al., 2016) e *Aspidosperma pyrifolium* Mart (Pereiro) indicado no tratamento de distúrbios respiratórios (bronquites e enfisemas), febres, dores de estômago e êmese (SANTOS, 2011).

Desde a Antiguidade, as plantas medicinais têm sido utilizadas para aliviar a dor causada por doenças, lesões e cirurgias (CHIDIAC et al., 2012). Antes da descoberta dos anestésicos, o ópio (suco da papoula) era utilizado para “anestesiá-lo” o paciente provocando uma isquemia cerebral e um desmaio momentâneo, auxiliando o cirurgião da época (FARIAS, MARZOLA, 2001).

A cocaína foi o primeiro anestésico local moderno, isolada de um alcalóide específico da coca (*Erythroxylum coca*, do gênero *Erythroxylaceae*) por Nieman, em 1860 (TSUCHIYA, 2017). Em 1980, Carl Koller residente em oftalmologia, experimentou a cocaína em animais e humanos aplicando uma solução no globo ocular, descobrindo assim o efeito anestésico da cocaína nos olhos. Pouco tempo depois, ele realizou com sucesso a cirurgia de catarata usando cocaína como anestésico tópico (AT) (KOLLER, 1982). Em seguida desenvolveu a anestesia local com cocaína injetável e seu uso para raquianestesia (TSUCHIYA, 2017).

A partir de novas pesquisas farmacológicas, a cocaína teve sua estrutura molecular alterada com intuito de desenvolver drogas mais seguras e eficazes. Em 1904, Alfred Einhorn sintetizou a procaína para substituir a cocaína, seguida por uma série de drogas sintéticas, derivadas da cocaína: tetracaína, lidocaína, bupivacaína, mepivacaína, prilocaína, ropivacaína, etidocapina e levobupivacaína (TSUCHIYA, 2017).

Os anestésicos locais (ALs) são essenciais no controle da dor na odontologia pois bloqueiam reversivelmente a condução nervosa, permitindo que uma ampla variedade de procedimentos seja realizada (KUMAR et al., 2015). Entretanto, as injeções de AL geralmente induzem medo e ansiedade em pacientes de todas as idades e são frequentemente a razão para o adiamento das consultas odontológicas e até a rejeição do tratamento (DAVOUDI et al., 2016). Conseqüentemente, medidas eficazes para mitigar a dor e a ansiedade e reduzir a necessidade de sedação devem ser empregadas.

Os pacientes relatam frequentemente uma sensação de ardência durante a injeção de anestésicos. Uma possível explicação para essa sensação desconfortável é a natureza ácida dos anestésicos locais comercialmente disponíveis (pH 4,5, aproximadamente), característica física importante em prolongar o tempo de validade dos anestésicos (HARRELD et al., 2015; SCHELLENBERG et al., 2015; SHURTZ et al., 2015). Os ALs bloqueiam reversivelmente os canais de Na^+ que são responsáveis pela iniciação e propagação dos potenciais de ação das células excitáveis do sistema nervoso periférico (FOZZARD, LEE, LIPKIND, 2005).

A estrutura química dos ALs é formada por uma extremidade hidrofílica, responsável pela difusão no líquido extracelular (amina secundária ou terciária); uma extremidade lipofílica, responsável pela penetração da base anestésica na fibra nervosa (grupo aromático); e uma cadeia intermediária. A cadeia intermediária une as duas extremidades e, de acordo com sua natureza química, permite classificar os anestésicos em ésteres ou amidas (TSUCHIYA, MIZOGAMI, 2013). Os anestésicos do tipo éster foram os primeiros a serem utilizados, como a cocaína, procaína e benzocaína, no entanto, os anestésicos do tipo amida são mais estáveis, as suas reações de hipersensibilidade são raríssimas e, por sofrerem metabolismo hepático, têm maior duração de ação. Como representantes do grupo amida podem-se citar: lidocaína, prilocaína, mepivacaína, bupivacaína e articaína (TSUCHIYA, 2017).

O AT, na forma de gel, mais utilizado na odontologia é a benzocaina 20 % (LATHWAL et al., 2015), entretanto não apresenta uma ação anestésica eficaz para os procedimentos odontológicos (RIBEIRO et al., 2016), sendo indicado, principalmente na exodontia de dentes

decíduos (AGARWAL et al., 2017) e antecedendo a anestesia infiltrativa (GONDIM et al., 2018).

Os ATs impedem a transmissão dos impulsos nervosos, promovendo anestesia cutânea pela atuação nas terminações nervosas livres dérmicas. Atuam bloqueando a condução do impulso nervoso pela inibição do influxo de sódio, o limiar para a excitação do nervo aumenta até que ocorra a perda da capacidade de gerar um potencial de ação (ABT, 2010; KOAY, ORENGO, 2002). Os analgésicos tópicos produzem um efeito específico local com inibição das ciclooxygenases, produzindo analgesia através da dessensibilização dos nociceptores epidérmicos (BARKIN, 2013).

Os ATs estão disponíveis como pomadas, géis, sprays ou material adesivo no qual o ideal é aquele que promove anestesia local em curto período de tempo, atua na pele íntegra sem causar efeitos adversos sistêmicos e não causa dor ou desconforto. A busca do agente anestésico ideal se deve também, a dificuldade de conseguir difusão e distribuição adequadas através da pele (FROES, OTTONI, GONTIJO, 2010). Os anestésicos tópicos são bases fracas com três componentes: um anel aromático, uma cadeia intermediária éster ou amida e uma amina terciária (AMIN, GOLDBERG, 2005).

O controle da dor dos pacientes representa um desafio por suas múltiplas dimensões, classificadas em aguda ou crônica, leve, moderada ou grave, nociceptiva ou neuropática. Os analgésicos administrados por via oral são usados frequentemente e estão associados à segurança e tolerância que podem restringir seu uso em determinados pacientes (BARKIN, 2013). Uma opção viável é a administração de analgésicos tópicos que oferecem efeitos colaterais mínimos com alívio da dor comparado aos analgésicos orais (CHARLES, ARGOFF, 2013).

Para suprir a necessidade de fármacos com ação anestésica para odontologia, uma ação viável são pesquisas com plantas medicinais, já que o Brasil detém cerca de um terço da biodiversidade mundial. Entretanto, no âmbito das pesquisas com finalidade medicamentosa, seu avanço é modesto, devido ao grande número de produtos ainda não estudados, principalmente os decorrentes de plantas do Semiárido Brasileiro (PYLRO et al., 2014). As pesquisas existentes encontram-se centralizadas nas universidades, mas são ações que não chegam, em sua maioria, até à obtenção do produto final (fitoterápico) (TRIBESS et al., 2015).

Na odontologia as pesquisas com fitoterápicos vêm avançando (MARTÍNEZ, DÍAZ GÓMEZ, OH, 2017) principalmente no desenvolvimento de novos anestésicos tópicos, que possam substituir em alguns procedimentos a anestesia infiltrativa por ocasionar desconforto,

medo e ansiedade ao paciente nos procedimentos odontológicos (FRANZ-MONTAN et al., 2017; OGLE, 2012).

A família Apocynaceae possui em torno de 200 gêneros e 2000 espécies, em regiões tropical e subtropical. O gênero *Aspidosperma* ocorre apenas na América (PEREIRO, et al., 2007), desde o México até a Argentina, e distingue-se pela ocorrência de alcalóides indólicos (JÁCOME, SOUZA, OLIVEIRA, 2003), um metabólito secundário responsável pela defesa desta plantas contra predadores, e provável responsável por seus efeitos farmacológicos (OLIVEIRA et al., 2009).

Foram identificados ainda 247 alcalóides indólicos isolados do gênero *Aspidosperma* (PEREIRA et al., 2007). Os extratos de plantas apresentam vários compostos químicos majoritários (KHODJA et al., 2018) que podem ser isolados (ALTEMIMI et al., 2017) e produzir diversos efeitos farmacológicos, favorecendo o desenvolvimento de novos fitoterápicos (ATANASOV et al., 2015).

Aspidosperma pyrifolium Mart. pertence a família Apocynaceae, sendo conhecida popularmente como "pereiro" ou "peroba-rosa", é encontrada no cerrado brasileiro, em alguns países como Bolívia e Paraguai e principalmente, na caatinga nordestina brasileira (LE MOS, ZAPPI, 2012). “O pereiro” apresenta porte regular, podendo atingir até 5 metros de altura (BRAGA, 1976). A sua madeira é amplamente empregada para serviços de carpintaria por apresentar madeira de boa qualidade para estes fins (OLIVEIRA et al., 2009). Foram isolados do *Aspidosperma Pyrifolium* Mart. a pirifolina e a pirifolidina (CRAVEIRO, MATOS, SERRUR, 1983; GILBERT et al., 1960) encontrada na casca do caule, a aspidofilina nas folhas e a aspidospermina encontrada nas cascas das raízes (CRAVEIRO, MATOS, SERRUR, 1983). Em pesquisa realizada com *Aspidosperma pyrifolium* Mart originária da Bolívia foram identificados onze alcalóides inéditos da planta. Sendo eles: (-)-vincadiformina, O-demetilpalosina, haplocina, N-formilaspidospermidina, vallesina, desmethoxiaspidospermina, palosina, (-)-aspidospermina, aspidospermidina, akuammicina e tubotaiwina (MITAINE et al., 1996).

A *A. pyrifolium* é uma árvore conhecida popularmente pelos seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, tem sido estudada em pesquisas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, apresentando um efeito analgésico superior a dipirona (MESSIADES, 2014; RODRIGUES, 2015). No entanto, durante os testes farmacológicos em camundongos com extrato de *A. pyrifolium* nas concentrações de 250, 125 e 62,5 mg/mL, os animais aparentavam estar “anestesiados” (RODRIGUES, 2015) o

que instigou a investigação do efeito anestésico desse extrato e o desenvolvimento de um gel anestésico e analgésico tópico bucal com extrato desta planta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um gel anestésico e analgésico tópico bucal com extrato da *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

2.2 Objetivos específicos

- a) Obter o extrato nebulizado de *Aspidosperma pyrifolium* Mart., com estabilizante farmacotécnico;
- b) Realizar um estudo de compatibilidade entre o extrato e excipientes farmacêuticos;
- c) Investigar o efeito anestésico do extrato nebulizado de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.;
- d) Avaliar através de ensaios pré-clínicos a eficácia analgésica e anestésica do gel desenvolvido;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As cascas do caule de *Aspidosperma pyrifolium* Mart (figura 1) foram coletadas em área aberta do Distrito de São José da Mata, Campina Grande, PB (coordenadas S7°13'27,56" – W36°00'53,37"). O material foi identificado pelo prof. Leonardo Pessoa Félix e a exsicata depositada no herbário Jayme Coelho de Moraes da Universidade Federal da Paraíba, sob o número 20104.

Figura 1- *Aspidosperma pyrifolium* Mart. popularmente conhecido como “pereiro”.



Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

3.2 Obtenção do extrato

O material vegetal coletado foi seco em estufa de ventilação forçada à temperatura constante de 40°C e processado em moinho de facas, com granulometria em torno de 10 mesh. A droga vegetal foi então submetida à extração por turbólise, rotação de 6.000 Rpm por 15 minutos, com uma solução hidroetanólica a 50%, durante 15 minutos. Para a realização da extração, foram utilizados 20g da droga vegetal para cada 100 mL de solução extrativa. O extrato hidroetanólico foi seco em *Spray Dryer*, com temperatura de entrada de 120 °C, e

temperatura de saída entre 90 e 95 °C, com fluxo de alimentação de 8 mL por minuto. No processo de secagem, foram utilizado Aerosil® 200, na proporção de 20% do resíduo seco, como adjuvante farmacotécnico.

3.3 Estudos de Compatibilidade extrato-excipiente

Os Estudos de pré-formulação são o primeiro passo no desenvolvimento da forma farmacêutica mais indicada (BOHANEK et al., 2010). Neste estudo será utilizado o sistema de misturas binárias com objetivo de esclarecer eventuais incompatibilidades que possam surgir no processo de desenvolvimento farmacotécnico. Foram produzidas misturas binárias entre o extrato nebulizado e os excipientes farmacêuticos utilizados na produção de um gel.

3.3.1 Obtenção das Misturas Binárias

As misturas binárias foram produzidas na proporção de 1:1, utilizando três tipos de espessante, umectante e alcalinizante. Foram preparadas tendo as seguintes proporções:

- Extrato nebulizado + Carbômero 940 \Rightarrow 1:1;
- Extrato nebulizado + Hidroxietilcelulose \Rightarrow 1:1;
- Extrato nebulizado + Carboximetilcelulose \Rightarrow 1:1;
- Extrato nebulizado + Glicerina \Rightarrow 1:1;
- Extrato nebulizado + Sorbitol \Rightarrow 1:1;
- Extrato nebulizado + Propilenoglicol \Rightarrow 1:1;
- Extrato nebulizado + Trietanolamina \Rightarrow 1:1;
- Extrato nebulizado + Hidróxido de Cálcio \Rightarrow 1:1;
- Extrato nebulizado + Bicarbonato de sódio \Rightarrow 1:1.

O gel foi desenvolvido após a análise do comportamento térmico do extrato e das misturas binárias, com objetivo de prever qual o melhor excipiente a ser utilizado, dos selecionados para essa proposta, que não altere o processo de liberação do extrato nebulizado e nem a sua estabilidade térmica.

As misturas binárias que apresentaram prováveis incompatibilidades físicas, no estudo por análise térmica, foram analisadas pela técnica de Difração de Raios-X (DRX) e por Espectroscopia na Região do Infravermelho, com Transformada de Fourier (FT-IR), com

intuito de avaliar possíveis incompatibilidade química. A partir desses resultados também foram selecionados quais excipientes irão fazer parte da formulação do gel.

3.4 Análise do comportamento térmico do extrato e das misturas binárias

3.4.1 Análise Térmica Diferencial (DTA)

As curvas DTA das amostras foram obtidas num analisador térmico (DTG-60 Simultaneous DTA-TG Apparatus, Shimadzu, Japão) (figura 2) no qual foi utilizado num fluxo de nitrogênio, com 50mL/min., como gás de purga da amostra. A programação utilizada foi de 25 até 500°C, com razão de aquecimento de 10°C/min. A amostra foi acondicionada em um porta-amostra de alumínio. A massa utilizada foi de $2 \pm 1,0$ mg.

Figura 2- DTG-60 Simultaneous DTA-TG Apparatus, Shimadzu (Campina Grande-PB/2018).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

3.4.2 Difração de Raios-X (DRX)

As análises de DRX foi realizadas em um difratomer XRD 6100 (Shimadzu) (figura 3) com varredura de 10° a 70° (2 θ /mim), na escala 2 θ , e radiação Cu (K α 1). O equipamento foi operado a tensão de 40,0 KV e corrente de 30,0 mA. Os dados obtidos foram analisados pelo software Origin® versão 8.1.

Figura 3 - Difratorer XRD 6100, Shimadzu.



Fonte: <http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/difratometros/xrd-6100.shtml>

3.4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de FT-IR foi realizadas em um aparelho Perkin-Elmer modelo 1600 (figura 4), utilizando discos KBr, no intervalo de $4000 - 400\text{cm}^{-1}$.

Figura 4 -. Aparelho Perkin-Elmer modelo 1600, Spectralab.



Fonte: <http://www.spectralabsci.com/Products/Search.aspx>

3.5 Desenvolvimento do gel de Aspidosperma Pirifolium MART

O gel foi desenvolvido com os excipientes que não apresentaram incompatibilidade com o extrato. O espessante, carbopol a 2% foi solubilizado em água destilada. O pH da formulação

foi ajustado para 6,5 com auxílio de trietanolamina (alcalinizante). Em seguida foi solubilizado o extrato nebulizado nas concentrações de 62,5, 125 e 250 mg/kg em propilenoglicol (agente levigante). A mistura foi por fim incorporada ao gel.

3.6 Investigação da atividade farmacológica

3.6.1 Caracterização do estudo farmacológico

Trata-se de um estudo de caráter experimental *in vivo*, qualitativo, quantitativo e randomizado.

3.6.2 Aspectos Éticos

Para a realização deste estudo foi seguida as premissas da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Esta pesquisa foi submetido e aprovado através do nº 0062.2017.2 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) das Faculdades de Enfermagem e de Medicina Nova Esperança (FACENE/FAMENE) (ANEXO A).

3.6.3 Animais

Foram utilizados 143 camundongos machos swiss, da espécie *Mus musculus*, classe Mammalia, ordem Roedentia, família Muridae, provenientes do biotério das Faculdades de Enfermagem e de Medicina Nova Esperança (FACENE/FAMENE), situado no Município de João Pessoa–PB. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha, com temperatura controlada $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob iluminação controlada (12 hs de ciclo claro/escuro), com condições adequadas de ração e água *ad libitum*.

3.6.3.1 Critérios de inclusão e exclusão dos animais

Os animais selecionados nesta pesquisa foram camundongos machos, da espécie *Mus musculus*, com peso entre 25 a 35 gramas. Foram excluídos do estudo aqueles animais que apresentaram qualquer sinal ou sintoma de enfermidade local ou sistêmica.

3.6.4 Ensaios farmacológicos

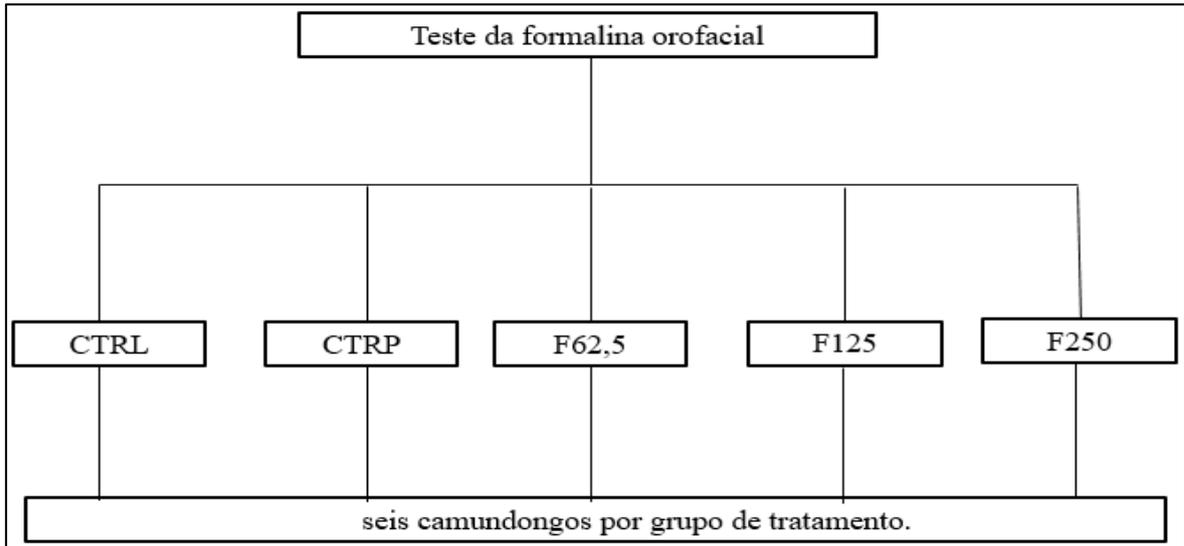
3.6.4.1 Teste da Formalina orofacial

O Teste da Formalina orofacial descrito inicialmente em ratos (CLAVELOU et al., 1989) e depois em camundongos (LUCCARINI et al., 2006), é utilizado para acessar processos nociceptivos na região orofacial. Foram realizados os seguintes tratamentos:

- **CTRL** - Gel desenvolvido com apenas excipientes farmacêuticos (controle negativo)
- **CTRP** - Benzocaína a 20% (controle positivo)
- **F62,5** - Gel de *A. Pyrifolium* Mart na proporção de 62,5mg/Kg
- **F125** - Gel de *A. Pyrifolium* Mart na proporção de 125mg/Kg
- **F250** - Gel de *A. Pyrifolium* Mart na proporção de 250mg/Kg

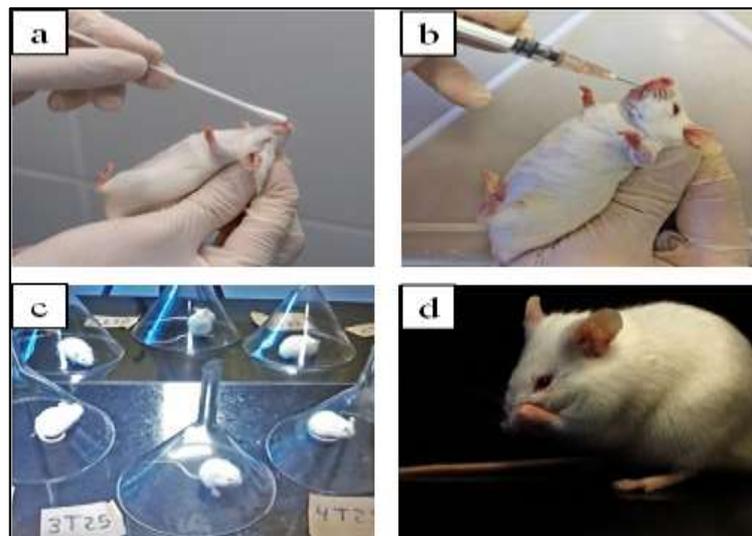
A aplicação tópica de 400mg (GONDIM et al., 2018) dos diversos tratamentos (grupos CTRL, CTRP, F62,5, F125 e F250) no lábio superior esquerdo de cada camundongo (n=6), foi realizada através de 20 fricções. Após 30 minutos (SHUMILOV et al., 2010) da administração dos tratamentos (5 minutos para o controle positivo, grupo CTRP (GONDIM et al., 2018), foi realizada a aplicação da injeção subcutânea de formalina (20 µl, 2%, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) no lábio superior esquerdo (área perinasal) (QUINTANS et al., 2014; SANTANA et al., 2011; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), e em seguida o comportamento nociceptivo foi avaliado durante duas fases: a primeira (fase neurogênica) ocorreu entre 0-5 minutos após a administração da formalina, seguida por um período de latência de cerca de 10 min, e a segunda fase (fase inflamatória) que ocorreu no período de 15-40 min após a administração da substância nociceptiva. Os animais foram observados individualmente em funis de vidro com espelhos posicionados posteriormente de forma a permite uma visão da geral de cada animal. Foi contabilizado o tempo (em segundos) que os animais empregaram esfregando a região orofacial com a pata ipsilateral anterior e/ou posterior (LUCCARINI et al., 2006), conforme descrição na figura 9. Uma câmera digital Sony AVCHD foi usada para gravar o comportamento nociceptivo dos animais (QUINTANS et al., 2014; QUINTANS-JÚNIOR et al. 2010).

Figura 5 - Fluxograma dos grupos de tratamento e número de animais no teste da formalina orofacial.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Figura 6 - Teste da formalina orofacial com aplicação tópica dos grupos CTRL, CTRP, T62,5, T125 e T250 no lábio superior esquerdo do camundongo (a). Aplicação da injeção subcutânea de formalina (20 μ l, 2%) no lábio superior esquerdo do animal (b). Os animais observados individualmente em funis de vidro com espelhos posicionados posteriormente de forma a permite uma visão da geral de cada camundongo (c). Os animais esfregando a região orofacial com a pata ipsilateral anterior e/ou posterior (d).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

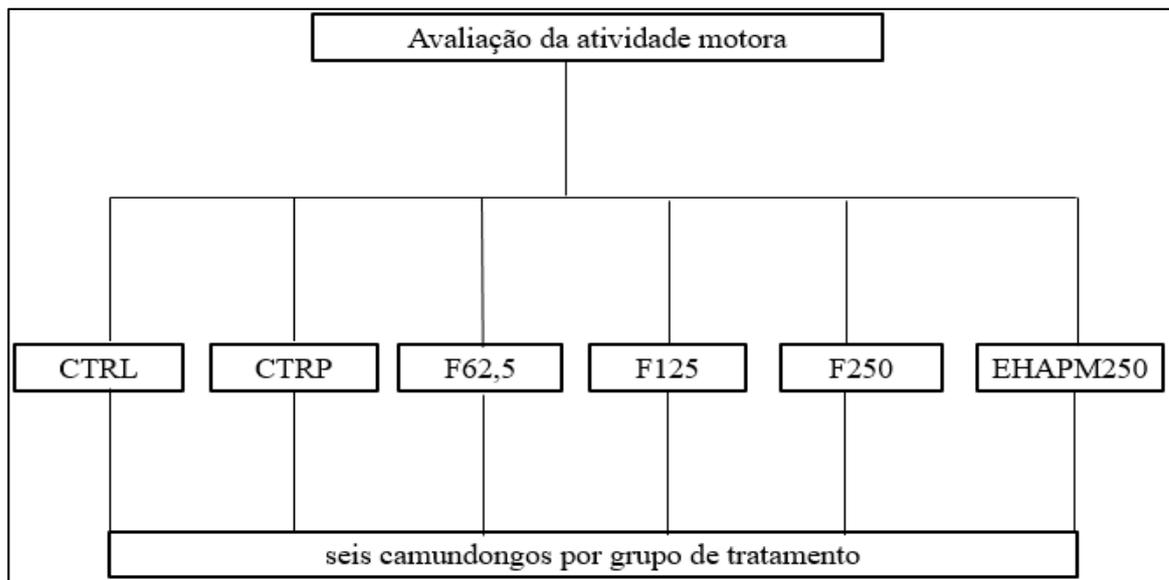
3.6.4.2 Teste da avaliação da atividade motora (Rota-rod)

O teste do Rota-rod (DUNHAM, MIYA, 1957) é usado para averiguar a influência dos tratamentos sobre a atividade motora de ratos e camundongos. Inicialmente os animais foram treinados por 24 horas antes do teste (SANTOS et al., 2015), sendo selecionados aqueles capazes de permanecer na barra giratória do aparelho, com rotação de 20 rpm (WANG et al., 2011), por mais de 120 segundos (figura10a) (QUINTANS et al., 2014). No dia seguinte, os camundongos selecionados receberam a aplicação tópica de 400mg (GONDIM et al., 2018) no lábio superior esquerdo (friccionando-se por 20 vezes), dos tratamentos descritos a seguir (n=6):

- **CTRN-** (controle negativo), gel desenvolvido com apenas os excipientes farmacêuticos;
- **CTRP-** (controle positivo), Benzotop® 200mg/g (benzocaína a 20%);
- **F62,5** - gel de APM na proporção de 62,5mg/kg;
- **F125** - gel de APM na proporção de 125mg/kg;
- **F250** - gel de APM na proporção de 250mg/kg;
- **EHAPM250** -administração por via oral (10mL/Kg) da maior concentração (250mg/kg) de APM diluído em salina fisiológica.

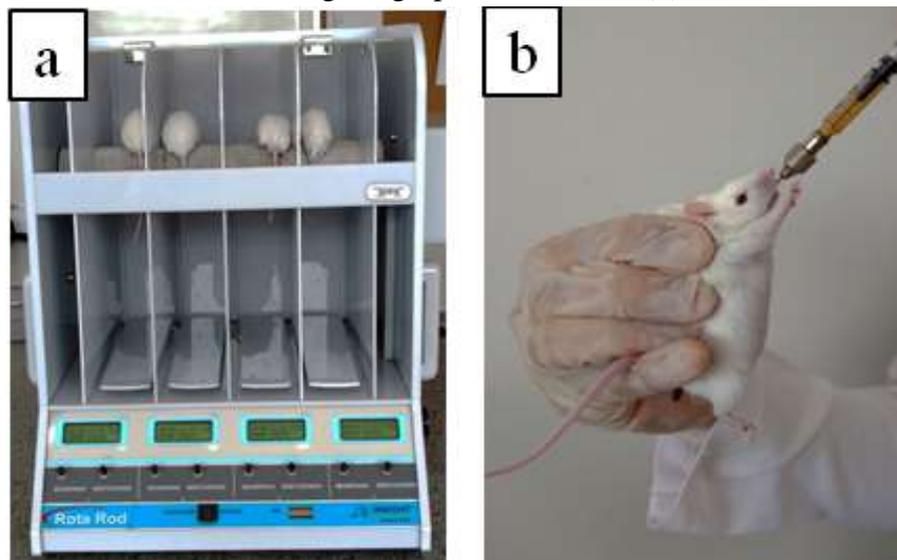
Após 30 minutos da aplicação tópica (com exceção do grupo CTRP, que utilizou-se um tempo de 5 minutos), os animais foram colocados na barra giratória (20 rpm) (WANG et al., 2011) por até 120 segundos (QUINTANS et al., 2014). Os animais que caíram da barra foram imediatamente reconduzidos ao aparelho, após cada queda, até o limite de 120 segundos. Foram registrados o tempo de permanência até a primeira queda e número de quedas de cada animal (figura 10) (QUINTANS-JUNIOR et al., 2010).

Figura 7- Fluxograma dos grupos de tratamento e número de animais no teste da avaliação da atividade motora (Rota-rod).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Figura 8 - O teste do Rota-rod (Insight, São Paulo-SP) com rotação de 20 rpm na barra giratória (a), com camundongos tratados por via oral (10mL/Kg) com a maior concentração (250mg/Kg) do EHAPM diluído em salina fisiológica, grupo EHAPM250 (b).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

3.6.4.3 Bloqueio do nervo ciático

O teste do bloqueio do nervo ciático (LESZCZYNSKA, KAU, 1992) é utilizado para determinar a atividade anestésica local em camundongos. Para tanto, os animais foram

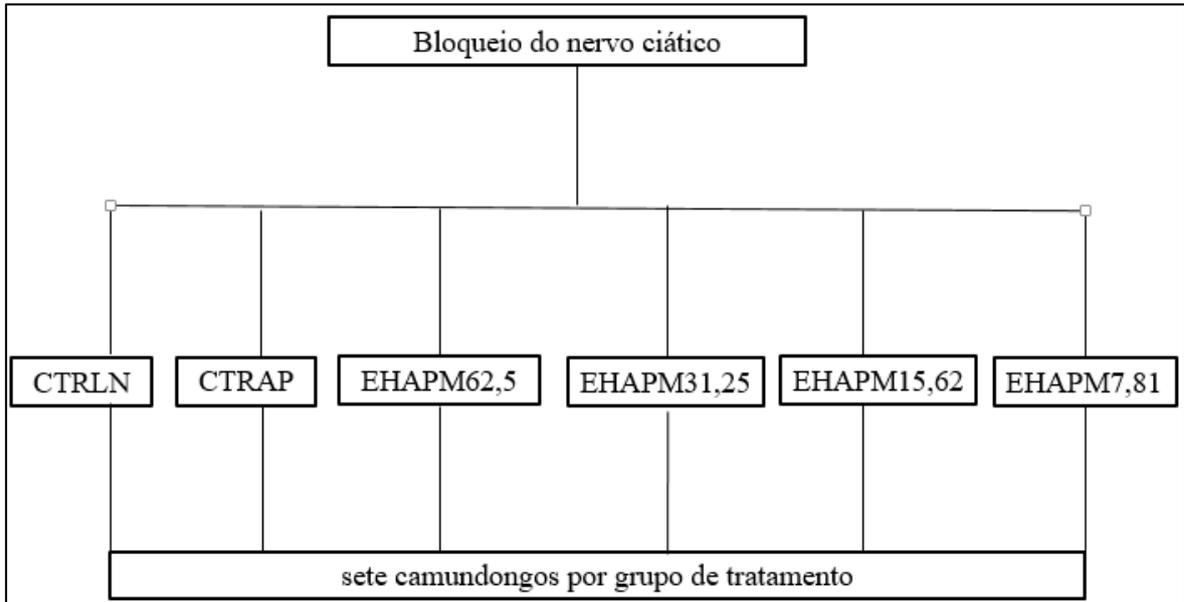
selecionados em 8 sessões de treinamentos, como descritos a seguir: os camundongos foram colocados no centro de uma tela metálica (fio 1 mm de diâmetro, malha de 5mm) invertida para que estes escalassem até a borda. Os animais com capacidade de andar normalmente na tela invertida, usando os quatro membros, foram selecionados para o ensaio farmacológico (LIM et al., 2007).

Os camundongos foram gentilmente contidos para administração de 0,05mL dos tratamentos, na região da fossa poplíteia da pata posterior esquerda (na região do nervo ciático) usando uma agulha de calibre 27G (LESZCZYNSKA, KAU, 1992). Os grupos experimentais (n=7) consistiram de:

- **CTRAP** - (controle positivo), lidocaína 5mg/mL (Sigma-Aldrich);
- **CTRLN** - (controle negativo), salina fisiológica;
- **EHAPM62,5** - extrato hidroetanólico das cascas de APM na concentração de 62,5mg/mL em salina fisiológica);
- **EHAPM31,25** - extrato hidroetanólico das cascas de APM na concentração de 31,25mg/mL em salina fisiológica);
- **EHAPM15,62** - extrato hidroetanólico das cascas de APM na concentração de 15,62mg/mL em salina fisiológica);
- **EHAPM7,81** - extrato hidroetanólico das cascas de APM na concentração de 7,81mg/mL em salina fisiológica).

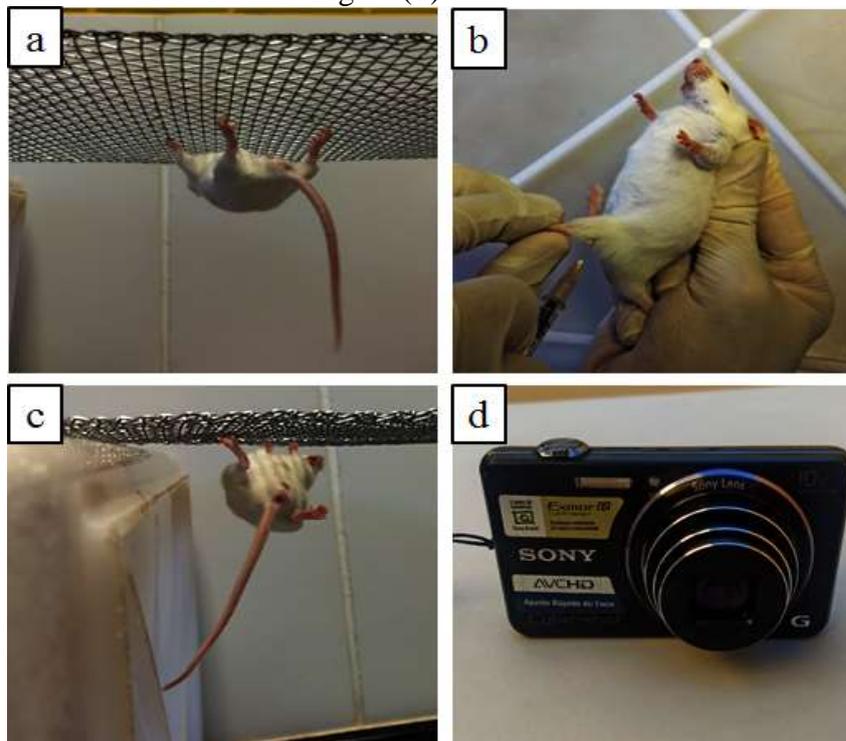
Após a injeção dos tratamentos na fossa poplíteia, nos tempos de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 120 minutos, os camundongos foram testados individualmente na tela metálica invertida, quanto a sua capacidade de usar a pata posterior esquerda para escalar a tela. Foi considerada presença de atividade anestésica quando o animal era incapaz de usar o membro injetado para escalar a tela (LIM et al., 2007). Todo este procedimento experimental foi gravado com uma câmera de vídeo (Sony® AVCHD) para posterior análise dos resultados (figura 11).

Figura 9 - Fluxograma dos grupos de tratamento e número de animais no teste do Bloqueio do nervo ciático.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Figura 10 - Animais com capacidade de andar normalmente na tela metálica (fio 1 mm de diâmetro, malha de 5mm) invertida, usando os quatro membros (a). Administração dos tratamentos dos grupos CTRAP, CTRLN, EHAPM 62,5, EHAPM 31,25, EHAPM 15,62, EHAPM 7,81, na região da fossa poplíteia da pata posterior esquerda (na região do nervo ciático) usando uma agulha de calibre 27G (b). Efeito anestésico de alguns tratamentos, detectado pela incapaz de usar o membro injetado para escalar a tela metálica (c). Câmera de vídeo (Sony® AVCHD) utilizada no ensaio farmacológico (d).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

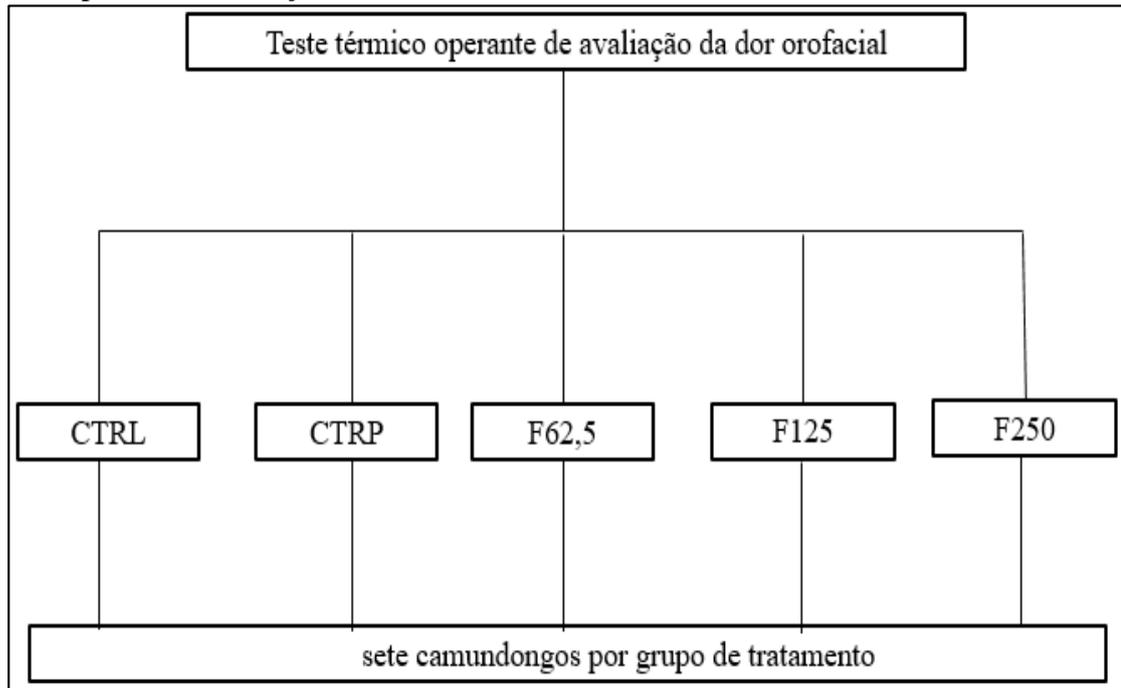
3.6.4.4 Teste térmico operante de avaliação da dor orofacial

Para avaliação dos efeitos dos diversos tratamentos sobre a sensibilidade orofacial foi utilizado um dispositivo térmico operante de avaliação da dor orofacial, semelhante ao desenvolvido por Neubert et al. (2005), e adaptado para camundongos por Neubert et al. (2008). Este aparato consiste de uma caixa de acrílico ($20\text{ cm}^2 \times 20\text{ cm}^2 \times 16\text{ cm}^2$) com uma abertura de 2 cm^2 em uma das paredes, no qual foi colocado o tubo de metal (cobre) em forma de U, conectado a um resistor, para mantê-lo aquecido a uma temperatura constante de 47° C , utilizando um amperímetro digital. Uma garrafa padrão de água para camundongos é montada ao lado de fora da caixa, de forma que, para beber a água o animal deverá obrigatoriamente encostar a região orofacial no tubo de metal aquecido. Uma câmera de vídeo (Sony® AVCHD) foi utilizada gravar todos os comportamentos dos animais para posterior análise dos resultados.

Inicialmente os camundongos foram treinados para localizarem as garrafas, contendo água e uma solução adoçada (1: 2, leite condensado Nestle®) à temperatura ambiente, em várias sessões sem e com jejum alimentar prévio de 12h. Para facilitar a localização da garrafa pelo animal, nas sessões iniciais foram colocados três animais juntos em cada caixa, já que a localização da garrafa por um camundongo irá indicá-la aos demais. Todos os animais treinados conseguiram localizar a garrafa em várias sessões.

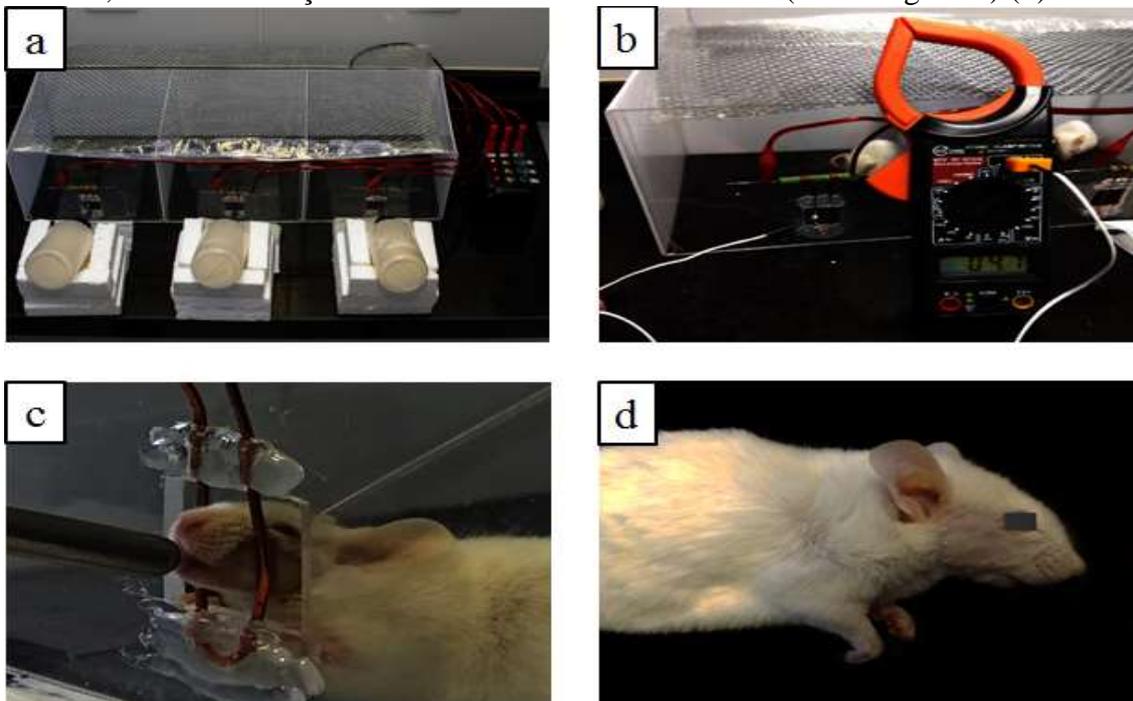
No dia anterior ao teste foi realizado a tricotomia da região orofacial dos animais sob anestesia geral com solução (0,01mL/10g) de ketamina (Cetamin®, cloridrato de Cetamin 10%) e xilazina (Dopaser®, cloridrato de xilazina 2%) na proporção de 2,5:1,5, respectivamente. Após jejum alimentar de 12h, os animais (n=7) receberam aplicações tópicas (50 fricções, com auxílio de swab estéril) na área tricotomizada direita e esquerda da região orofacial, de 400mg dos diversos tratamentos (grupos CTRL, CTRP, T62,5, T125 e T250). Após 5 minutos, os animais foram colocados no aparato e tiveram seu comportamento gravados por 30 minutos para análise posterior do tempo que os animais gastaram ingerindo a solução adocicada.

Figura 11 - Fluxograma dos grupos de tratamento e número de animais utilizando Teste térmico operante de avaliação da dor orofacial.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Figura 12 - Caixa de acrílico (20 cm² x 20 cm² x 16 cm²) com uma abertura de 2cm² em uma das paredes com tubo de metal (cobre) interligado a um dispositivo que transforma eletricidade em calor (a). Amperímetro digital DT266 utilizado no controle de temperatura do experimento (b). O animal obrigatoriamente encostar a região orofacial no tubo de metal aquecido para acesso garrafa padrão de água para camundongos (c). Tricotomia da região orofacial dos animais, área de inervação dos nervos maxilar e mandibular (nervo trigêmeo) (d).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

3.7 Eutásia dos animais

Terminado o período experimental, todos os animais foram eutanasiados através da injeção intraperitoneal de solução de Ketamina 10% (300 mg/Kg) e Xilazyna 2% (15 mg/Kg) seguida de deslocamento cervical.

3.8 Análise estatística

Na análise estatística foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados. Para os dados paramétricos utilizou-se a Análise de Variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, enquanto os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 ARTIGOS A SEREM SUBMETIDOS

Artigo 1 - **Desenvolvimento de um gel anestésico e analgésico tópico bucal com extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart** será submetido ao periódico *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.

Artigo 2 - **Avaliação da atividade anestésica e analgésica do gel bucal de *Aspidosperma pyrifolium* Mart** será submetido ao periódico *The Journal of Oral & Facial Pain and Headache*.

4.1 artigo 1

Desenvolvimento de um gel anestésico e analgésico tópico bucal com extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart

Roniery O. Costa¹, Cleildo P. Santana², Fernando Ramos¹, Isabel P. Rabello³, Ana Cláudia D. Medeiros^{1*}

¹Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, R. Baraúnas, 351, Bodocongó, Campina Grande, Paraíba 58429-500, Brasil. *E-mail: anaclaudia@uepb.edu.br

²Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte – Minas Gerais 31270-901, Brasil.

³Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste, R. Aprígio Veloso, nº 882, Bodocongó, Campina Grande, Paraíba 58429-900, Brasil.

Resumo

Aspidosperma pyrifolium Mart é uma planta nativa do semiárido brasileiro presente no bioma caatinga que apresenta propriedades farmacológicas com ênfase nos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um gel bucal anestésico, utilizando extrato de *A. pyrifolium* e métodos analíticos. As cascas desta planta foram coletadas no Distrito de São José da Mata, Campina Grande, PB. O material vegetal coletado foi seco em estufa de ventilação forçada à temperatura constante, em seguida submetida à extração por turbólise. O extrato produzido foi seco em *Spray Dryer*, utilizado Aerosil[®] 200, como adjuvante farmacotécnico. As misturas binárias entre o extrato da planta e os excipientes bicarbonato de sódio, carbômero 940, carboximetilcelulose, glicerina, hidróxido de cálcio, hidroetilcelulose, propilenoglicol, sorbitol e trietanolamina, foram avaliadas por análise térmica, difração de raios-X e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier. Os resultados mostraram que os excipientes farmacêuticos compatíveis com o extrato foram o carbômero 940, trietanolamina e propilenoglicol. Portanto, os métodos analíticos utilizados mostraram quais excipientes podem ser escolhidos, para melhorar a estabilidade da formulação.

Palavras-chaves: *Aspidosperma*, Excipientes Farmacêuticos, Estudo de Compatibilidade, Anestésico, Análise Térmica, Métodos Analíticos.

Introdução

Aspidosperma pyrifolium Mart. (APM) é uma planta pertencente à família Apocynaceae que possui cerca de 200 gêneros e 2000 espécies. O gênero *Aspidosperma* ocorre apenas na América, da Argentina ao México, e distingue-se pela ocorrência de alcalóides indólicos [1]. No Brasil, APM é nativa da caatinga nordestina, conhecida como "pereiro" ou "peroba-rosa", sua composição fitoquímica é composta por alcalóides, taninos, fenóis, flavonoides, xantonas, resinas e albumina [2], prováveis responsáveis por seus efeitos farmacológicos, principalmente os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios e anestésicos [3]. O extrato de APM foi caracterizado por Rodrigues [3] utilizando análise térmica (TG e DSC) e infravermelho próximo (NIR). Os resultados sugeriram a estabilidade do extrato com potencial para a produção de fitoterápicos.

Estudos de pré-formulação, principalmente os testes de compatibilidade são imprescindíveis na identificação dos excipientes farmacêuticos mais compatíveis com os extratos de plantas [4]. Além disso, as interações são avaliadas de acordo com a aparência, alterações ou desaparecimento de picos exotérmicos e endotérmicos e variações nos valores de entalpia nas curvas térmicas das misturas fármaco-excipiente [5,6].

Nem todas as interações sólido-sólido indicam uma incompatibilidade farmacêutica, pois técnicas como análises térmicas (TG, DTA e DSC) e técnicas analíticas (DRX e IF-TR), avaliam possíveis interações física e químicas, respectivamente, que podem favorecer ou não do desenvolvimento de novas formulações [7]. Portanto, o objetivo deste trabalho é desenvolver um gel bucal com extrato de *Aspidosperma prifolium* Mart

Material e Métodos

Obtenção do material vegetal e produção do extrato

As cascas de APM foram coletadas no Distrito de São José da Mata, Campina Grande, PB (coordenadas S7°13'27,56" – W36°00'53,37"). O material foi identificado e a exsicata depositada no herbário da Universidade Federal da Paraíba, sob o número 20104.

O material vegetal coletado foi seco em estufa de ventilação forçada à temperatura constante de 40°C e processado em moinho de facas, com granulometria em torno de 10 mesh. A droga vegetal foi então submetida à extração por turbólise, com uma solução hidroetanólica a 50%, durante 15 minutos. Para a realização da extração foram utilizados 20g da droga vegetal para cada 100 mL de solução extrativa. O extrato hidroetanólico foi seco em *Spray Dryer*, com temperatura de entrada de 120 °C, e temperatura de saída entre 90 e 95 °C, com fluxo de

alimentação de 8 mL por minuto. No processo de secagem foi utilizado Aerosil® 200, na proporção de 20%, como adjuvante farmacotécnico.

Estudo de compatibilidade extrato – excipientes farmacêuticos

As misturas binárias foram preparadas a partir de misturas físicas do extrato nebulizado de APM com os seguintes excipientes farmacêuticos: bicarbonato de sódio (BIC), carbopol (CBP), carboximetilcelulose (CMC), glicerina (GLI), hidróxido de cálcio (HID), hidróxidoetilcelulose (HEC), propilenoglicol (PRO), trietanolamina (TRI) e sorbitol (SOR). Os estudos foram realizados, utilizando três excipientes de cada classe (espessante, umectante e alcalinizante) em proporções de 1: 1.

Análise Térmica Diferencial (DTA)

As curvas DTA das amostras foram obtidas num analisador térmico, marca Shimadzu, no qual será utilizado num fluxo de nitrogênio, com 50mL/min., como gás de purga da amostra. A programação utilizada foi de 25 até 500°C, com razão de aquecimento de 10°C/min. A amostra será acondicionada em uma porta-amostra de alumínio. A massa utilizada foi de ± 2 mg.

Difração de Raios-x (DRX)

As análises de DRX foram realizadas em um difratômetro 6000 DRX (Shimadzu), com varredura de 10° a 70° (2 θ /min), na escala 2 θ , e radiação Cu (K α 1). O equipamento foi operado a tensão e 40,0 KV e corrente e 30,0 mA. Os dados obtidos foram analisados pelo software Origin® versão 8.1.

Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de FT-IR foram realizadas em um aparelho Perkin-Elmer modelo 1600, utilizando discos KBr, no intervalo de 4000 – 400cm⁻¹.

Resultados e discussão

Estudo de compatibilidade por DTA

A fig. 1 e 2 apresenta a curva de DTA do extrato, enquanto a tabela 1 mostram os picos e entalpia dos eventos térmicos que foram observados nas curvas DTA. A curva do extrato apresentou três picos endotérmico, sendo o primeiro observado em 77,35 °C ($\Delta H = -110,45$ J g⁻¹).

¹), provavelmente relacionado com a perda de água, solvente ou compostos voláteis. Rodrigues (2015) caracterizou o extrato dessa planta no DSC, e observou também três etapas endotérmicas, com início do processo de decomposição em 294,27 °C ($\Delta H = 74,67 \text{ J g}^{-1}$).

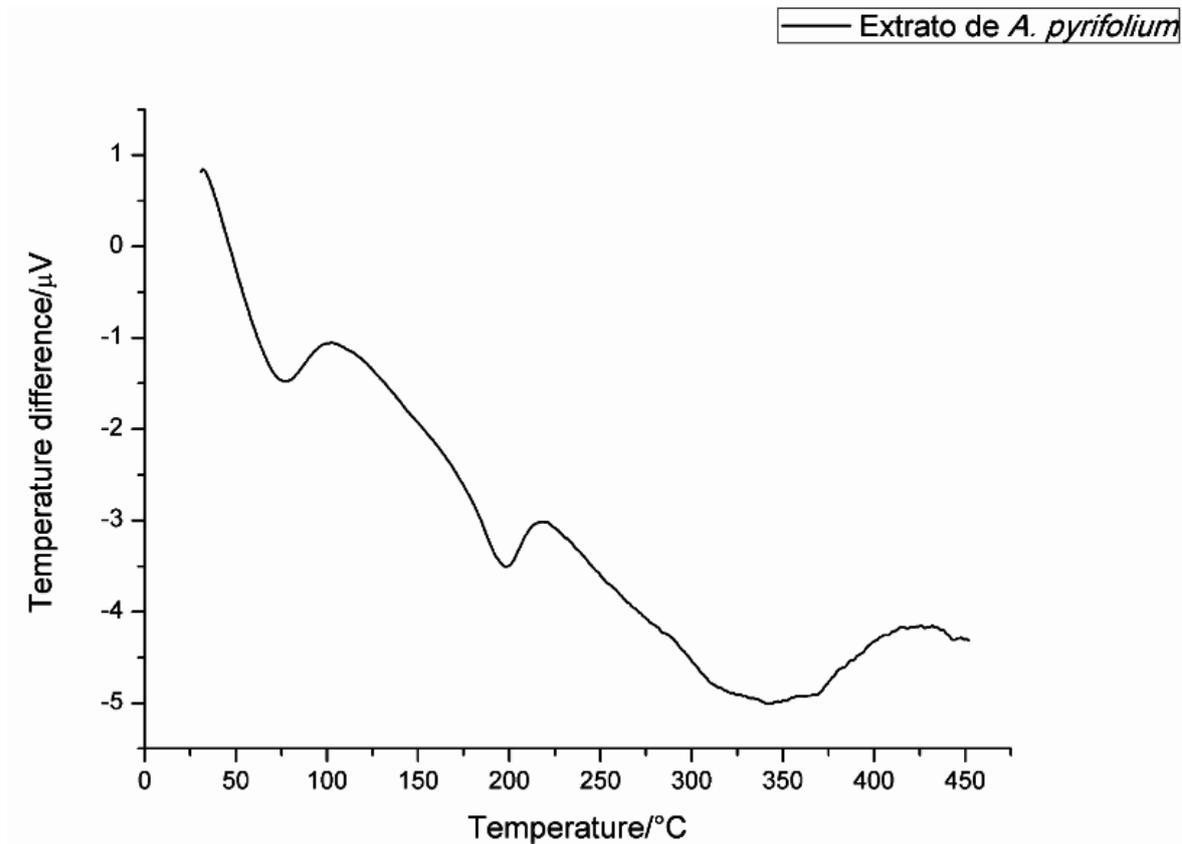


Fig. 1 Curva DTA do extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

As misturas do extrato de APM com CBP e HEC apresentaram compatibilidade, conforme descrito na figura 2 (b) e (f). Nessas misturas observaram-se um somatório e retardamento dos picos de calor, não apresentando indícios de interações com os excipientes. Na mistura com CBP (Fig. 2b) apresenta uma temperatura de degradação de 381,40 °C (Tabela 1), no qual a literatura relata que esse excipiente sofre transição vítrea entre 100 e 105 °C com decomposição em temperaturas acima de 260 °C [8], características ratificadas na tabela 1, com temperatura de degradação em 272,20 °C.

As misturas do extrato de APM com BIC, CMC, GLI, HID, PRO, TRI e SOR apresentaram possíveis indícios de interações, necessitando a análise por DRX e FT-IR. Nas misturas binárias com BIC (Fig 2a) e GLI (Fig. 2d) observaram uma antecipação do pico de fusão e consequentemente da temperatura de decomposição, conforme descrito da tabela 1, as temperaturas de 183,10 °C e 289,71 °C, para o BIC e GLI, respectivamente. Rowe e

colaboradores (2009) evidenciam que a degradação do BIC é em torno de 270 °C, no entanto, o ponto de fusão e de degradação da GLI é 290 °C.

A mistura com CMC, HID, PRO e TRI, descritos nas fig. 2 (c), (e), (g) e (i) apresentaram o desaparecimento de picos, nas curvas DTA, que sugeriu possíveis incompatibilidades entre o extrato e os excipientes, necessitando a análise por DRX e IF-TR. The Merck Index descreve o ponto de fusão do PRO em 188,2 °C, valor próximo ao encontrado na pesquisa no valor de 198,93 °C. A literatura relata que o ponto de ebulição da TRI é 335,4 °C (The Merck Index, 2013), entretanto, na tabela 1, a mistura do extrato com este excipiente, antecipou o ponto de ebulição para 331,9 °C, além do desaparecimento do 3º pico do extrato, em temperatura superior a descrita. O HID não apresentou pico e quando associado ao extrato foi degradado a partir de 425,20 °C (2º pico) e segundo Handbook of Pharmaceutical Excipients, o HID não se funde, mas desidrata-se completamente formando CaO acima de 580 °C. Na mistura com carboximetilcelulose houve a supressão do 2º pico do extrato, no entanto, Rowe e colaboradores (2009) relata que este excipiente farmacêutico inicia-se a decomposição a cerca de 227 °C, carbonizando-se a 252 °C, justificando assim, a análise pelo FT-IR.

A mistura do extrato com SOR (fig 2h) apresentou no DTA, o surgimento de novo pico exotérmico ($\Delta H = 70,49 \text{ J.g}^{-1}$) a 348,42 °C, necessitando sua análise por DRX e IF-TR. No entanto, o pico endotérmico dessa mistura ocorreu em 122,24 °C [8].

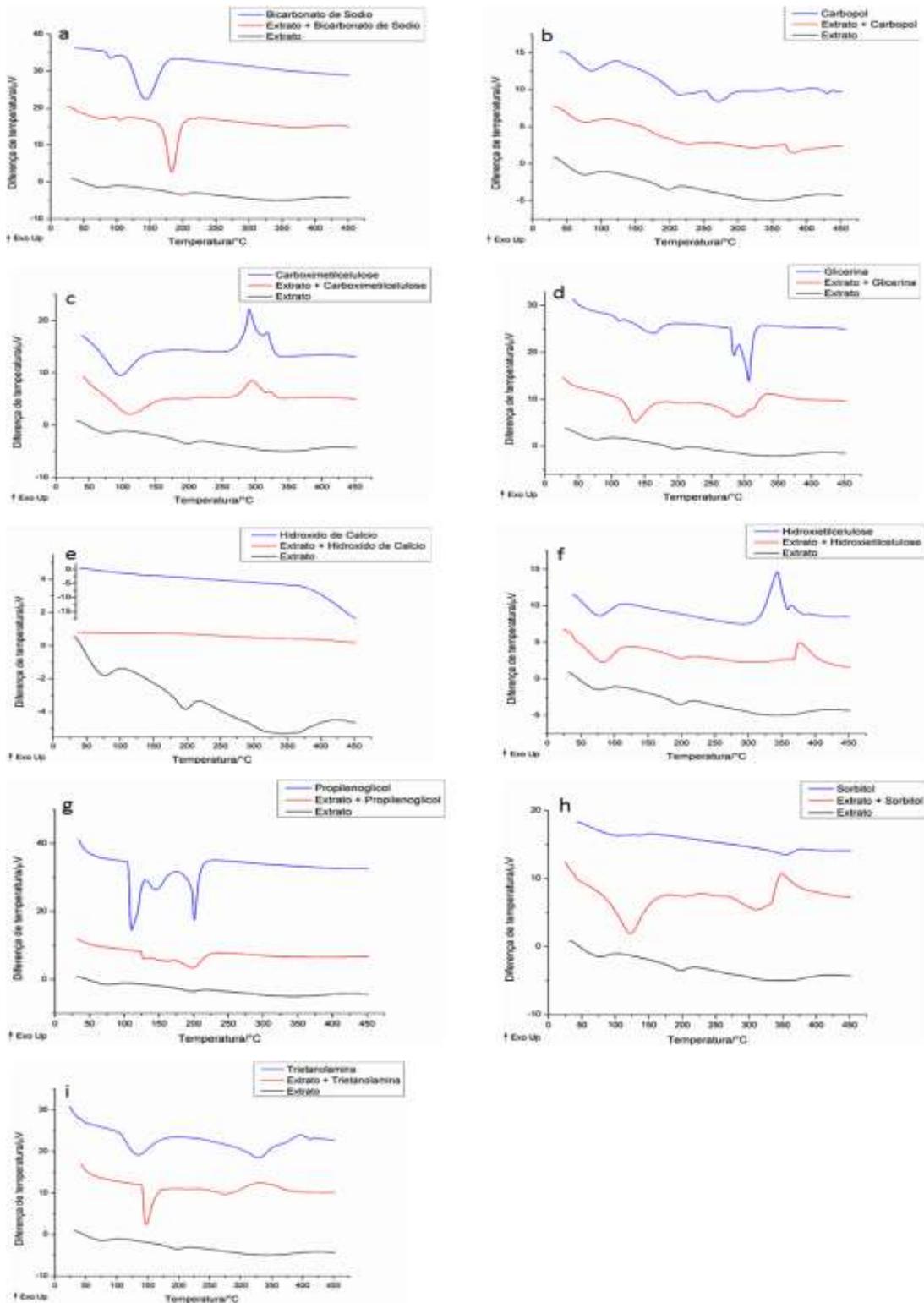


Fig. 2 Curvas de DTA do extrato de APM, excipientes e misturas binárias (a) bicarbonato de sódio, (b) carbopol, (c) carboximetilcelulose, (d) glicerina, (e) hidróxido de cálcio, (f) hidroxiethylcelulose, (g) propilenoglicol, (h) sorbitol, (i) trietanolamina.

Tabela 1. Dados das curvas DTA referentes às etapas de decomposição do extrato APM, excipientes farmacêuticos e misturas binárias.

Difração de raios-X (DRX)

Amostras foram analisadas por difração de raios-x (DRX), e os difratogramas correspondentes apresentam-se dispostos na fig. 3. Foram produzidas misturas binárias entre o extrato e os excipientes na proporção de 1:1, no intuito de aumentar a probabilidade da ocorrência de alterações cristalográficas que pudessem ser detectadas nas análises realizadas.

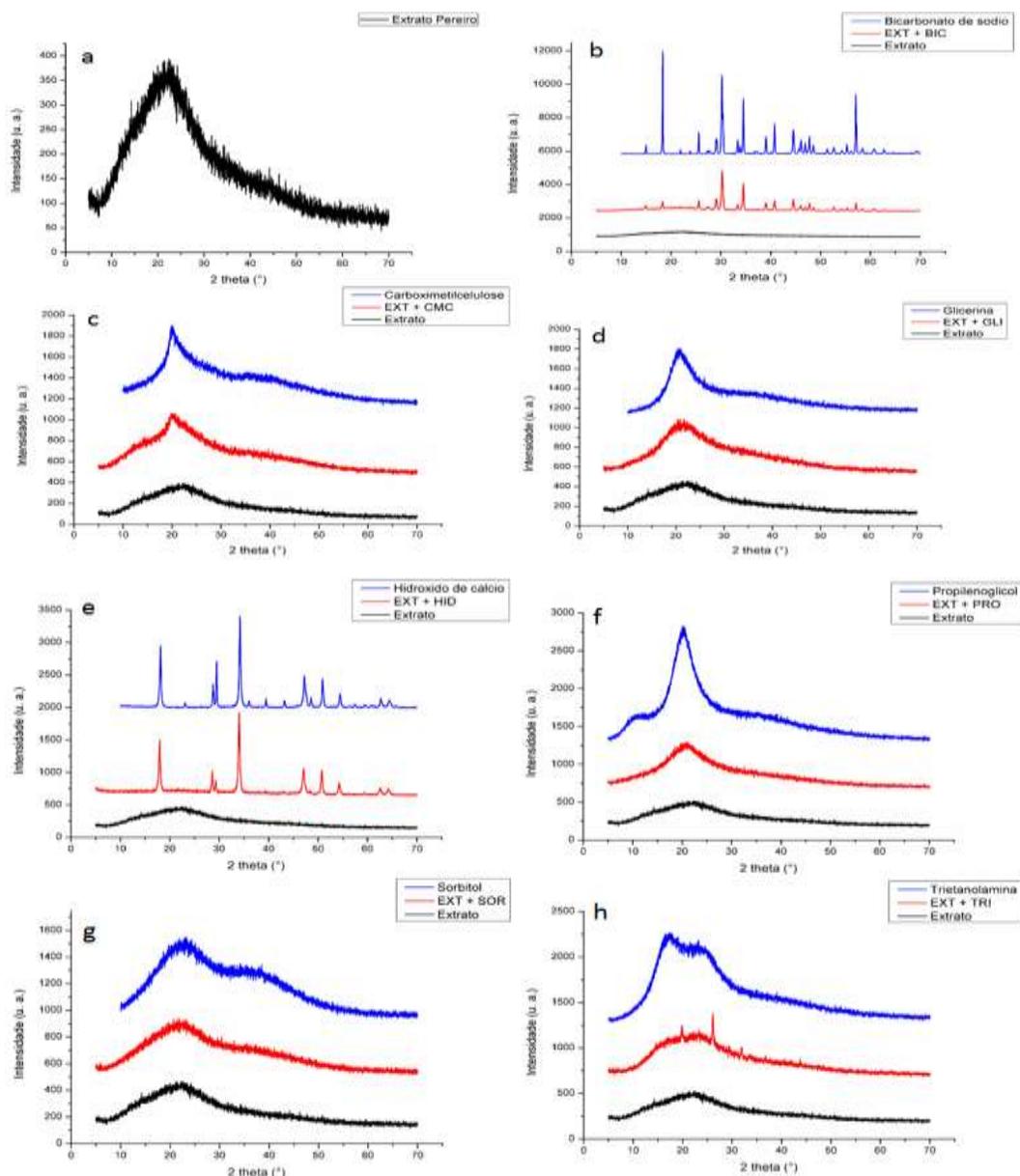


Fig. 3 Curvas de Difração de Raios-X do extrato e suas misturas binárias: (a) APM (b) bicarbonato de Sódio, (c) carboximetilcelulose, (d) glicerina, (e) hidróxido de cálcio, (f) propilenoglicol, (g) sorbitol e (h) trietanolamina.

O perfil difratográfico referente ao extrato de APM é apresentado na fig. 3a, sob a forma de um ruído característico de extrato amorfo, conforme o esperado para este tipo de amostra. A característica amorfa do extrato vegetal é atribuída, principalmente, à sua composição complexa e variável de fitocompostos com diferentes estruturas moleculares [9]. O conjunto destas substâncias, ao ser submetido a um processo de secagem, não permite a formação de estruturas organizadas sólidas de mesma composição (cristais). A conformação amorfa do extrato seco confere a estas propriedades como baixa estabilidade físico-química, alta higroscopicidade e características pobres de fluxo [10].

O ruído característico do perfil difratográfico do extrato seco apresenta uma baixa intensidade de sinal detectado, conforme observado no eixo y da fig. 3a. Ao ser combinado em mistura com excipientes altamente organizados como BIC (fig. 3b) e HID (fig. 3e), a intensidade dos picos cristalinos destes tende a ser reduzida. Entretanto, para ambos os excipientes, a conservação da presença dos picos em seus ângulos característicos aponta que não houveram mudanças estruturais nestes, sugerindo, desta forma, a compatibilidade de ambos com o extrato no estado sólido.

Muitos componentes utilizados em formulações farmacêuticas são amorfos, como é o caso de polímeros, a exemplo da CMC (fig. 3c). A mistura binária deste excipiente com o extrato seco apresentou um perfil cristalográfico muito semelhante ao difratograma da CMC isolada. Esta possível superposição pode ser atribuída ao maior tamanho das moléculas deste polímero em relação àquelas que compõem o extrato, entretanto, não sugere que haja interação ou incompatibilidade entre os componentes da mistura.

Os excipientes SOR, PRO e GLI apresentaram, inicialmente, perfis difratográficos completamente amorfos (fig. 3g, 3f e 3d, respectivamente), que podem ser atribuídos principalmente à sua conformação sob a forma líquida. Na presença do extrato, as misturas binárias produzidas também apresentaram perfis amorfos. Estes perfis resultantes, que podem sugerir a dissolução do extrato juntamente com o excipiente, também não fornecem evidências de incompatibilidade entre os componentes, haja visto a conservação dos perfis de ambos os componentes.

O perfil difratográfico da TRI (fig. 3h), de maneira semelhante, também se apresentou sob a forma de um ruído, caracteristicamente amorfo, atribuído à forma líquida de apresentação deste excipiente. A mistura produzida entre este e o extrato seco apresentou difratograma

predominantemente amorfo, entretanto, com o surgimento de três picos de cristalinidade que foram detectados nos ângulos de 19,88, 26,10 e 31,90°.

O surgimento destes picos na mistura binária sugere a ocorrência de cristalização decorrente da combinação do extrato seco com a TRI. É possível que a formação de cristais ocorra em decorrência desta combinação, uma vez que a presença deste excipiente de caráter alcalino pode causar a precipitação de substâncias alcalinas do extrato, a exemplo de alcaloides [10].

O surgimento de picos de cristalinidade na mistura binária entre o extrato seco e a TRI constitui evidência de uma possível incompatibilidade entre estes componentes e, uma vez que a precipitação de substâncias sob a forma de cristais poderia alterar a composição do extrato numa formulação, esta interação caracterizaria uma incompatibilidade física ou química que poderia levar a perda de eficácia ou de segurança da formulação, devendo, desta forma, ser devidamente investigada.

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro FT-IR referente ao extrato de APM (fig. 4a) apresentou, na faixa entre 3700 e 3008 cm^{-1} , uma banda de absorção larga de média intensidade, indicativo da presença de grupamentos hidroxila (estiramento -OH) [11]. O surgimento desta banda de absorção é esperado, tendo em vista a grande proporção de moléculas hidroxiladas numa amostra proveniente de fonte vegetal, uma vez que nesta é marcante a presença de compostos polifenólicos. A banda de absorção presente entre 2996 e 2777 cm^{-1} , estreita e de baixa intensidade, é indicativa de estiramentos de ligações C-H de alta frequência, podendo ser atribuída à natureza orgânica dos compostos presentes no extrato vegetal.

Uma banda estreita e fraca na região entre 1784 e 1537 cm^{-1} , presente no espectro do extrato, juntamente com uma banda forte e estreita entre 1303 e 883 cm^{-1} , são indicativos de deformações em ligações C=O de grupos carbonila [11], que provavelmente se relacionam com uma ampla variedade de compostos presentes em extratos vegetais, como taninos, flavonoides, polifenóis e antraquinonas. As demais bandas de absorção tiveram seu registro prejudicado, provavelmente devido à forte sobreposição de picos, uma vez que o extrato é uma mistura complexa de diferentes substâncias, produzidas por meio de diversas vias químicas em um organismo vivo.

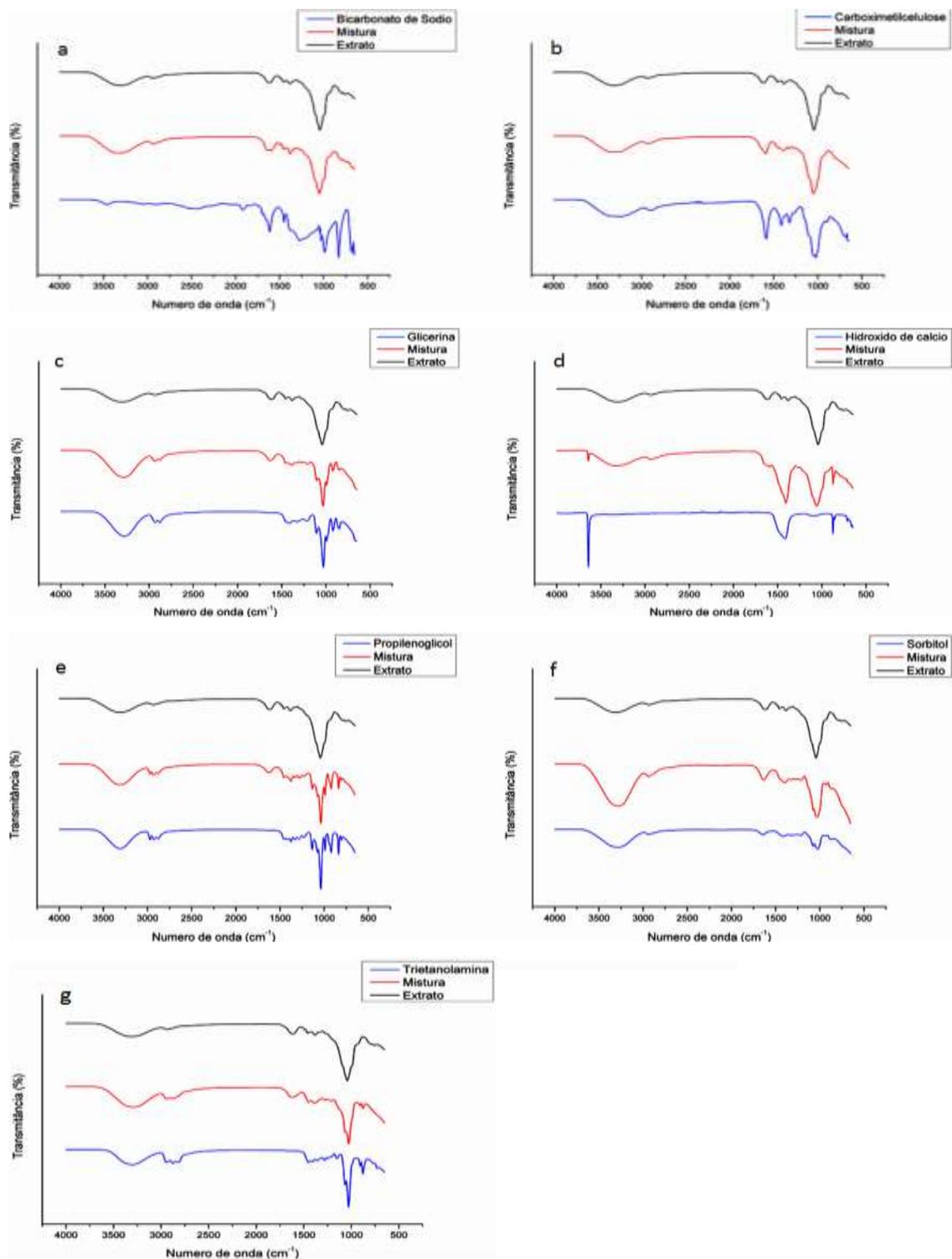


Fig. 4 Espectros do IF-IR do extrato com as misturas binárias: (a) bicarbonato de Sódio, (b) carboximetilcelulose, (c) glicerina, (d) hidróxido de cálcio, (e) propilenoglicol, (f) sorbitol e (g) trietanolamina.

A mistura binária entre o extrato de APM e o BIC (Fig. 4a) apresentou uma banda larga de média intensidade (3678 a 3013 cm^{-1}) e uma banda estreita e fraca (2991 a 2802 cm^{-1}). Ambas as bandas são semelhantes às aquelas observadas na mesma faixa no espectro do extrato, sendo atribuídas à presença deste. De maneira semelhante, as bandas de absorção presentes no extrato em 1784 - 1537 , 1500 - 1355 e 1303 - 883 cm^{-1} foram conservadas na mistura binária. Entretanto, as bandas de absorção presentes no espectro do excipiente em 864 - 745 e 734 - 664 cm^{-1} (deformações de hidrogênio fora do plano) foram suprimidas, indicando ocorrência de incompatibilidades químicas entre os componentes da mistura.

O espectro da mistura entre o extrato de APM e o CMC (fig. 4b) apresentou, em 3705 - 3011 cm^{-1} uma banda sugestiva de grupos hidroxila semelhante às aquelas observadas nos espectros do extrato e do excipiente. Esses grupamentos hidroxila podem ser detectados, provavelmente, tanto em virtude da presença de moléculas hidroxiladas nas amostras quanto também à presença de água livre nestas, tendo em vista sua natureza amorfa e higroscópica. As bandas observadas em 2969 - 2764 , 1771 - 1529 , 1193 - 855 cm^{-1} mantiveram-se conservadas tanto em relação ao extrato quanto ao excipiente. As bandas apresentadas pela mistura em 1424 - 1395 e 1349 - 1297 são provavelmente oriundas da presença do excipiente. Desta forma, não foram observadas, no espectro desta mistura, alterações de bandas que sugerissem a ocorrência de interação química entre o extrato e o CMC.

O espectro da mistura entre o extrato e a GLI (fig. 4c) apresentou uma banda sugestiva de hidroxilas em 3681 - 3002 cm^{-1} , a qual está presente tanto no espectro do extrato quanto do excipiente. Duas bandas estreitas e fracas entre 2986 e 2800 cm^{-1} (sugestiva de estiramento de CH alifático) foram registradas para a mistura, sendo esta associada à presença da glicerina na mistura. A banda apresentada na mistura entre 1772 e 1544 cm^{-1} provavelmente corresponde àquela referente aos grupamentos C=O presentes no extrato. A banda de absorção do extrato entre 1303 e 883 cm^{-1} encontra-se sobreposta, no espectro da mistura, à três outras bandas de absorção da glicerina, nas regiões de 1154 - 1082 , 1082 - 1006 e 1006 - 946 cm^{-1} , não sendo observadas, para essa mistura, supressões ou outros sinais indicativos de incompatibilidade química.

O espectro obtido para o HID (fig. 4d) apresentou bandas de absorção características para este excipiente. Uma banda estreita e forte entre 3678 e 3581 cm^{-1} sugere o estiramento característico de ligações O-H nas hidroxilas ligadas ao cálcio, não sendo observada a presença de água livre na amostra. As bandas de intensidade fraca em 1623 - 1286 , 1179 - 987 e 887 - 826 cm^{-1} são sugestivas de diferentes modos de vibração das ligações C-O nos grupos carbonato [12]. Todas as

bandas do excipiente e do extrato mantiveram-se conservadas no espectro da mistura binária, não sendo observadas alterações sugestivas de interações químicas entre os componentes.

De maneira semelhante, também não foram observados indícios de interação química entre o extrato e o PRO (fig. 4e). A banda de absorção em $3652\text{-}3034\text{ cm}^{-1}$ sugere o estiramento das ligações O-H presentes não só nas moléculas constituintes do extrato e do excipiente, mas provavelmente também na umidade presente na amostra. A banda tripla em $3009\text{-}2782\text{ cm}^{-1}$ sugere o estiramento C-H em carbonos primários e secundários, observado também no espectro do excipiente. As bandas presentes em 1140 , 1041 e 842 cm^{-1} são sugestivas de deformações C-O fora do plano em moléculas do excipiente, estando presentes também no espectro da mistura binária. Em 993 e 926 cm^{-1} é possível observar bandas sugestivas de deformações C-H fora do plano, presentes no espectro do excipiente e reproduzidas no espectro da mistura binária. A conservação de todas as bandas de absorção do extrato e do excipiente permite sugerir a ausência de incompatibilidade química entre o extrato e o PRO.

O espectro da mistura entre o extrato e o SOR (fig. 4f) apresentou bandas de absorção presentes nos espectros de ambos os componentes, É provável a ocorrência de sobreposição de bandas no espectro desta mistura devido à semelhança entre os espectros dos componentes isolados, atribuída à semelhante composição de compostos orgânicos e hidroxilados no extrato e no excipiente. Ainda assim, é possível sugerir a ausência de incompatibilidades químicas entre o extrato e o SOR.

A amostra de TRI (fig. 4g) apresentou bandas de absorção características para esta substância. A banda forte e larga em $3652\text{-}3015\text{ cm}^{-1}$ sugere o estiramento O-H em hidroxilas adsorvidas na amostra. A banda tripla em $3015\text{-}2739\text{ cm}^{-1}$ é sugestiva de estiramento C-H de carbonos primários e secundários. As bandas presentes entre 1456 e 1113 cm^{-1} são associadas a vibrações em ligações C-C e C-H fora do plano. Duas bandas fortes e estreitas em $1110\text{-}964\text{ cm}^{-1}$ sugere o estiramento de ligações C-O e C-N. Já as bandas observadas entre 929 e 833 cm^{-1} provavelmente estão associadas a vibrações fora do plano de C-N, C-C, C-O ou C-C-O [13]. Uma vez que todas as bandas de absorção do excipiente e do extrato mantiveram-se conservadas no espectro da mistura binária, é possível afirmar que não houveram indícios de incompatibilidade química entre o extrato e a TRI.

Conclusão

O estudo de compatibilidade realizado por DTA, DRX e FTIR, entre o extrato de *A. pyrifolium* e excipientes farmacêuticos utilizados no desenvolvimento de formulações semissólidas mostraram que apenas o bicarbonato de sódio apresentou incompatibilidade química com o extrato. E que dentre os excipientes farmacêuticos compatíveis como o extrato foram escolhidos para o desenvolvimento do gel anestésico e analgésico o carbopol, trietanolamina e propilenoglicol. Portanto, os métodos analíticos utilizados mostraram quais excipientes podem ser escolhidos, para melhorar a estabilidade da formulação.

Referências

1. Oliveira VB, Freitas MSM, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira IJC. Biological activity and indole alkaloid of the genus *Aspidosperma* (Apocynaceae): a review. *Rev Bras Pl Med.* 2009;11: 92-9.
2. Araújo Jr JX, Antheaume C, Trindade RCP, Schmitt M, Bourguignon JJ, Sant'Ana AEG. Isolation and characterisation of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. *Phytochem Rev.* 2007; 6: 183-88.
3. Rodrigues JVM, Desenvolvimento de uma solução oral com atividade analgésica a partir de extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart, 2015, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba.
4. Fernandes FHA, Almeida VE, Medeiros FD, Silva PCD, Simões MOS, Verás G, Medeiros ACD. Evaluation of compatibility between *Schinopsis brasiliensis* Engler extract and pharmaceutical excipients using analytical techniques associated with chemometric tools. *J Therm Anal Calorim.* 2016; 123: 2531-42.
5. Kumar V, Shah RP, Malik S, Singh S. Compatibility of atenolol with excipients: LC-MS/TOF characterization of degradation/interaction products, and mechanisms of their formation. *J Pharm Biomed Anal.* 2009; 49: 880-88.
6. Julio TA, Zâmara IF, Garcia JS, Trevisan MG. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC-UV, *J Therm Anal Calorim.* 2013; 111: 2037-44.

7. Pani NR, Nath, LK, Acharya S, Bhuniya B. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. *J Therm Anal Calorim.* 2012; 108: 219–26
8. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Handbook of pharmaceutical excipients, 6th ed, London: Pharmaceutical Press; American Pharmacists Association, 2009.
9. Fernandes FH, Santana CP, Santos RL, Correia LP, Conceição MM, Macêdo RO, Medeiros ACD, Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. *J Therm Anal Calorim.* 2013; 113: 443-47.
10. Gallo L, Llabot JM, Allemandi D, Bucalá V, Pinã J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. *Powder Technol*, 2011; 208: 205-214.
11. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA, Principles of Instrumental Analysis, 5th ed, Philadelphia: Harcourt Brace & Company, 1998.
12. Khachani MH, El Hamidi A, Halim M, Arsalane S, Non-isothermal kinetic and thermodynamic studies of the dehydroxylation process of synthetic calcium hydroxide Ca (OH) 2. *J Mater Environ Sci.* 2014; 5: 615-24.
13. Xu Y, Al-Salim N, Tilley RD, Synthesis and size dependent reflectance study of water soluble SNS nanoparticles. *Nanomaterials.* 2012; 2: 54-4.

4.2 Artigo 2

Avaliação da atividade anestésica e analgésica do gel bucal de *Aspidosperma pyrifolium* Mart

Ronierly de Oliveira Costa¹, Vanda Lúcia dos Santos², João Walter de Souza da Silveira³ João Vinicius Barbosa Roberto⁴, Ana Cláudia Dantas de Medeiros⁵

¹Doutorando em Odontologia pelo Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, Brasil;

²Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Professora do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, Brasil;

³Doutor em Farmacologia com pós-doutoramento pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, Brasil;

⁴Doutor em Medicina Veterinária e Professor da Faculdade de Enfermagem e de Medicina Nova Esperança (FACENE/FAMENE), João Pessoa-PB, Brasil;

⁵Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos com Pós-doutorado em Fármacos e Medicamentos, Professora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade anestésica e analgésica de gel bucal de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. **Métodos:** Foram utilizados 143 camundongos machos swiss com peso entre 25 a 35 gramas, na avaliação da atividade motora (Rota-rod), teste da formalina orofacial, teste térmico operante de avaliação da dor orofacial e bloqueio do nervo ciático. Utilizaram 5 grupos experimentais: controle negativo, benzocaína a 20% e os géis de *A. pyrifolium* com 62,5, 125 e 250 mg/kg, com exceção do último ensaio, que avaliou a atividade anestésica do extrato no nervo ciático em 62,5, 31,25, 10,4 e 3,125mg/mL. Foi avaliado também a atividade motora do camundongo, utilizando do extrato por 250mg/kg via oral, além dos ensaios da formalina orofacial e do teste térmico operante de avaliação da dor orofacial. **Resultados:** O extrato e géis de *A. pyrifolium* não deprimiram o sistema nervoso central do camundongo. Os tratamentos de 62,5, 125 e 250 mg/kg inibiram significativamente a dor no lábio esquerdo do camundongo comparado a benzocaína 20% em 5 ($p < 0,01$) e entre 15 e 40 minutos após administração da formalina orofacial ($p < 0,001$). O extrato em 62,5 mg/kg apresentou atividade anestésica significativa em relação a 31,25, 10,4, 3,125mg/mL, solução salina 0,9% e lidocaína 5mg/mL ($p < 0,001$). Os géis de *A. pyrifolium* apresentaram excelente atividade antinociceptiva em 125mg/kg comparado a benzocaína 20% em 1 ($p < 0,01$), 5 ($p < 0,001$) e 10 ($p < 0,05$) minutos após a inserção do animal na gaiola de acrílico e, em 1 ($p < 0,01$) e 5 ($p < 0,01$) minutos com 250mg/kg comparado ao controle negativo. **Conclusão:** Os géis de *A. pyrifolium* com 125 e 250mg/kg apresentam excelente efeito antinociceptivo,

decorrentes da sua ação anestésicas e analgésicas, que podem favorecer sua utilização na clínica odontológica.

Palavras-Chaves: Dor Orofacial; Aspidospermas; Anestesia Local; Anestesia e Analgesia.

INTRODUÇÃO

As pesquisas com fitoterápicos vêm avançando na odontologia¹ principalmente no desenvolvimento de novos anestésicos tópicos, que possam substituir em alguns procedimentos a anestesia infiltrativa por ocasionar desconforto, medo e ansiedade ao paciente nos procedimentos odontológicos^{2,3}.

O primeiro anestésico tópico desenvolvido utilizou a cocaína (alcaloide) isolada da planta *Erythroxylum coca*⁴, utilizada com sucesso na oftalmologia em cirurgia de catarata⁵. A partir de novos estudos, a cocaína teve sua estrutura molecular alterada com intuito de desenvolver drogas sintéticas anestésicas, mais seguras e eficazes, destacando-se a lidocaína, bupivacaína, mepivacaína, prilocaína, ropivacaína, etidocapina e levobupivacaína⁴.

O anestésico tópico, na forma de gel, mais utilizado na odontologia é a benzocaína 20 %⁶, entretanto não apresenta uma ação anestésica eficaz para os procedimentos odontológicos⁷, sendo indicado, principalmente na exodontia de dentes decíduos⁸ e antecedendo a anestesia infiltrativa.⁹

Aspidosperma pyrifolium Mart. (APM) ou “pereiro” é uma árvore nativa da caatinga nordestina, conhecida na medicina tradicional pelos seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, apresentando um efeito analgésico superior a dipirona^{10,11}. O objetivo desse trabalho foi avaliação da atividade anestésica e analgésica do gel bucal de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato hidroetanólico das cascas de APM (EHAPM)

As cascas de APM foram coletadas no Distrito de São José da Mata, Campina Grande, PB (coordenadas S7°13'27,56" – W36°00'53,37"). O material foi identificado e a exsicata depositada no herbário da Universidade Federal da Paraíba, sob o número 20104.

O material vegetal coletado foi seco em estufa de ventilação forçada à temperatura constante de 40°C e processado em moinho de facas, com granulometria em torno de 10 mesh. A droga vegetal foi então submetida à extração por turbólise, com uma solução hidroetanólica a 50%,

durante 15 minutos. Para a realização da extração foram utilizados 20g da droga vegetal para cada 100 mL de solução extrativa. O extrato hidroetanólico foi seco em *Spray Dryer*, com temperatura de entrada de 120 °C, e temperatura de saída entre 90 e 95 °C, com fluxo de alimentação de 8 mL por minuto. No processo de secagem foi utilizado Aerosil® 200, na proporção de 20%, como adjuvante farmacotécnico.

Desenvolvimento do gel de APM

O gel foi desenvolvido, tendo com base o estudo de compatibilidade realizado anteriormente. A formulação do gel foi produzida com os seguintes excipientes: carbômero 940, propilenoglicol e trietanolamina.

Animais

Foram utilizados 143 camundongos machos Swiss adultos, da espécie *Mus musculus*, classe Mammalia, ordem Roentia, família Muridae, entre 25 a 35 gramas, provenientes do biotério das Faculdades de Enfermagem e de Medicina Nova Esperança (FACENE/FAMENE), situado no Município de João Pessoa– PB. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha, com temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação (12 hs de ciclo claro/escuro, com os experimentos realizados no período claro do ciclo) controlada, com condições adequadas de ração e água *ad libitum*. Foram excluídos do estudo aqueles animais que apresentaram qualquer sinal ou sintoma de enfermidade local ou sistêmica. Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) da FACENE/FAMENE através do nº 0062.2017.2.

Teste da Formalina orofacial

O Teste da Formalina orofacial descrito inicialmente em ratos¹² e depois em camundongos,¹³ é utilizado para acessar processos nociceptivos na região orofacial. A aplicação tópica de 400mg⁹ dos diversos tratamentos (grupos CTRL, CTRP, F62,5, F125 e F250) no lábio superior esquerdo de cada camundongo (n=6), foi realizada através de 20 fricções. Após 30 minutos¹⁴ da administração dos tratamentos (5 minutos para o controle positivo, grupo CTRP⁹), foi realizada a aplicação da injeção subcutânea de formalina (20 µl, 2%) no lábio superior esquerdo (área

perinasal),^{15,16,17} e em seguida o comportamento nociceptivo foi avaliado durante duas fases: a primeira (fase neurogênica) que ocorreu entre 0-5 minutos após a administração da formalina, seguida por um período de latência de cerca de 10 min; e a segunda fase (fase inflamatória) que ocorreu no período de 15-40 min, após a administração da formalina. Os animais foram observados individualmente em funis de vidro com espelhos posicionados posteriormente de forma a permitir uma visão da geral de cada animal. Foi contabilizado o tempo (em segundos) que os animais empregaram esfregando a região orofacial com a pata ipsilateral anterior e posterior.¹³ Uma câmera digital Sony AVCHD foi usada para gravar o comportamento nociceptivo dos animais.^{15,16}

Avaliação da atividade motora (Rota-rod)

O teste do Rota-rod¹⁸ é usado para averiguar a influência dos tratamentos sobre a atividade motora de ratos e camundongos. Inicialmente os animais foram treinados 24 horas antes do teste¹⁹ e selecionados aqueles capazes de permanecer na barra giratória do aparelho, com rotação de 20 rpm²⁰ por mais de 120 segundos.¹⁵ No dia seguinte, os camundongos selecionados receberam a aplicação tópica de 400mg⁹ no lábio superior esquerdo (friccionando-se por 20 vezes), dos tratamentos descritos a seguir (n=6):

- **CTRN** (controle negativo) - gel desenvolvido com apenas os excipientes farmacêuticos;
- **CTRP** (controle positivo) - Benzotop[®] 200mg/g (benzocaína a 20%);
- **F62,5**, gel de APM na proporção de 62,5mg/kg;
- **F125**, gel de APM na proporção de 125mg/kg;
- **F250** - gel de APM na proporção de 250mg/kg;
- **EHAPM250** - administração por via oral (10mL/kg) da maior concentração (250mg/kg) de APM diluído em salina fisiológica.

Após 30 minutos da aplicação tópica (com exceção do grupo CTRP, que utilizou-se um tempo de 5 minutos), os animais foram colocados na barra giratória (20 rpm)²⁰, por até 120 segundos¹⁵. Os animais que caíram da barra foram imediatamente reconduzidos ao aparelho, após cada queda, até o limite de 120 segundos. Foram registrados o tempo de permanência até a primeira queda e número de quedas de cada animal.¹⁶

Bloqueio do nervo ciático

O teste do bloqueio do nervo ciático²¹ é utilizado para determinar a atividade anestésica local em camundongos. Para tanto, os animais foram selecionados em 8 sessões de treinamentos, como descritos a seguir: os camundongos foram colocados no centro de uma tela metálica (fio 1 mm de diâmetro, malha de 5mm) invertida para que estes escalassem até a borda. Os animais com capacidade de andar normalmente na tela invertida, usando os quatro membros, foram selecionados para o ensaio farmacológico.²²

Os camundongos foram gentilmente contidos para administração de 0,05mL dos tratamentos, na região da fossa poplíteia da pata posterior esquerda (na região do nervo ciático) (figura 1a) usando uma agulha de calibre 27G.²¹ Os grupos experimentais (n=7) consistiram de:

- **CTRAP** (controle positivo), lidocaína 5mg/mL (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil);
- **CTRLN** (controle negativo), salina fisiológica;
- **EHAPM62,5**, (extrato hidroetanólico das cascas de APM na concentração de 62,5mg/mL em salina fisiológica);
- **EHAPM31,25** (extrato hidroetanólico das cascas de APM na concentração de 31,25mg/mL em salina fisiológica);
- **EHAPM15,62** (extrato hidroetanólico das cascas de APM na concentração de 15,62mg/mL em salina fisiológica);
- **EHAPM7,81** (extrato hidroetanólico das cascas de APM na concentração de 7,81mg/mL em salina fisiológica).

Após a injeção dos tratamentos na fossa poplíteia, nos tempos de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 120 minutos, os camundongos foram testados individualmente na tela metálica invertida, quanto da sua capacidade de usar a pata posterior esquerda para escalar a tela. Foi considerada presença de atividade anestésica quando o animal foi incapaz de usar o membro injetado para escalar a tela²² (figura 1b). Todo este procedimento experimental foi gravado com uma câmera de vídeo (Sony® AVCHD) para posterior análise dos resultados.

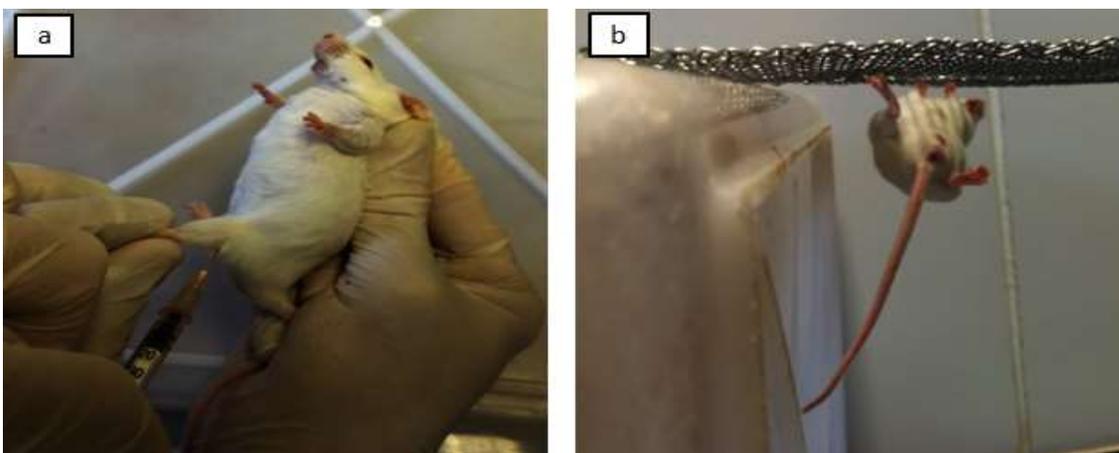


Figura 1. Aplicação dos tratamentos dos grupos CTRAP, CTRLN, EHAPM62,5, EHAPM31,25, EHAPM15,62 e EHAPM7,81 no nervo ciático do camundongo (a) com anestesia da pata esquerda (b).

Teste térmico operante de avaliação da dor orofacial

Para avaliação dos efeitos dos diversos tratamentos sobre a sensibilidade orofacial foi utilizado um dispositivo térmico operante de avaliação da dor orofacial, semelhante ao desenvolvido por Neubert et al. (2005)²³, e adaptado para camundongos por Neubert et al. (2008).²⁴ Este aparato consiste de uma caixa de acrílico (20 cm² x 20 cm² x 16 cm²) com uma abertura de 2cm² em uma das paredes, no qual foi colocado o tubo de metal (cobre) em forma de U, conectado a um resistor, para mantê-lo aquecido a uma temperatura constante de 47° C. Uma garrafa padrão de água para camundongos é montada ao lado de fora da caixa, de forma que, para beber a água o animal deverá obrigatoriamente encostar a região orofacial no tubo de metal aquecido. Uma câmera de vídeo (Sony® AVCHD) é utilizada gravar todos os comportamentos dos animais para posterior análise dos resultados, que é feita de forma cega.

Inicialmente os camundongos foram treinados para localizarem as garrafas contendo uma solução adocicada à temperatura ambiente, em várias sessões sem e com jejum alimentar prévio de 12h. Para facilitar a localização da garrafa pelo animal, nas sessões iniciais foram colocados três animais juntos em cada caixa, já que a localização da garrafa por um camundongo irá indicá-la aos demais. Todos os animais treinados conseguiram localizar a garrafa em várias sessões.²⁴

No dia anterior ao teste foi realizado a tricotomia da região orofacial dos animais sob anestesia geral com solução (0,01mL/10g) de ketamina a 10% e xilazina a 2%, na proporção de 2,5:1,5, respectivamente. Após jejum alimentar de 12h, os animais (n=7) receberam aplicação

tópica (50 fricções, com auxílio de swab estéril) na área tricotomizada direita e esquerda da região orofacial, de 400mg⁹ dos diversos tratamentos (grupos CTRL, CTRP, T62,5, T125 e T250). Após 5 minutos, os animais foram colocados no aparato e tiveram seu comportamento gravados por 30 minutos, para análise posterior do tempo que os animais gastaram ingerindo a solução adocicada (figura 2).

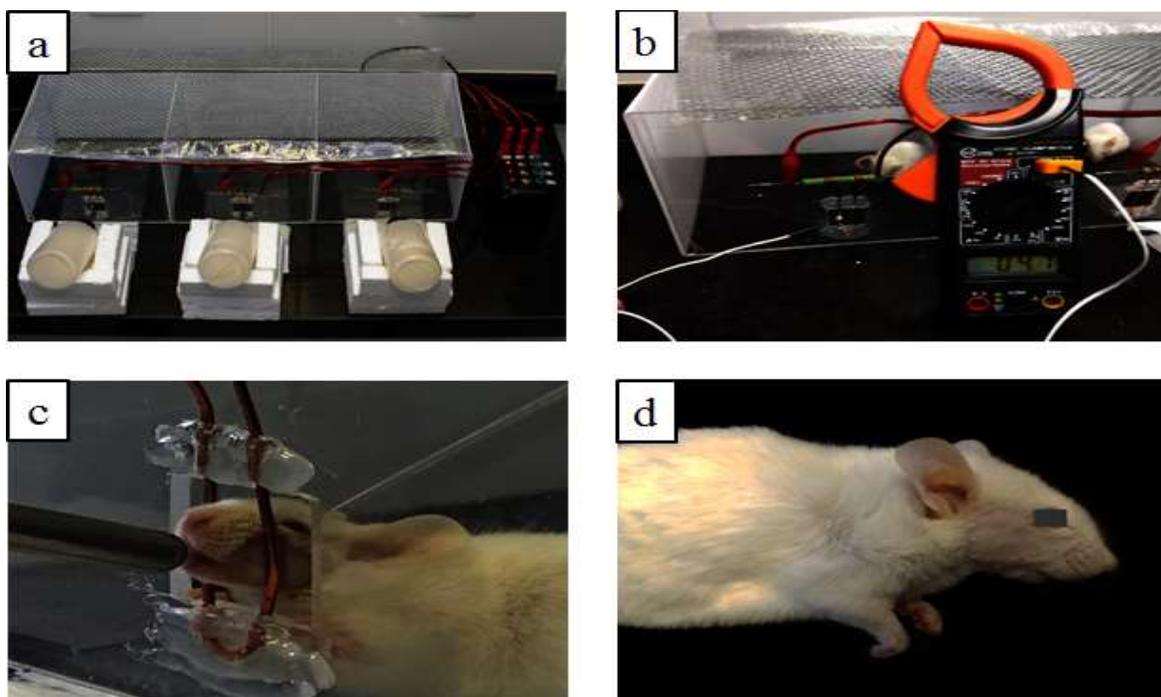


Figura 2 - Teste térmico operante de avaliação da dor orofacial realizado em caixa de acrílico interligado a um dispositivo que transforma eletricidade em calor (a). Amperímetro digital DT266 utilizado no controle de temperatura do experimento (b). Contato da região orofacial do camundongo com o tubo de metal aquecido para acesso garrafa padrão de água (c). Tricotomia da região orofacial dos animais, área de inervação dos nervos maxilar e mandibular (nervo trigêmeo) (d).

Eutanásia dos Animais

Após o término do período experimental, todos os animais foram eutanasiados através da injeção intraperitoneal de solução de Ketamina a 10% (300 mg/kg) e Xilazyna a 2% (15 mg/kg) seguida de deslocamento cervical.

Análise Estatística

Na análise estatística foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados. Para os dados paramétricos utilizou-se a Análise de Variância de uma via (one-way

ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, enquanto os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

No teste da formalina orofacial, observou-se na primeira fase (Figura 3a) e segunda fase (Figura 3b) que os grupos F62,5, F125 e F250 apresentaram um menor tempo de fricção da região orofacial, no lábio superior esquerdo do animal, em comparação aos CTRL e CTRP.

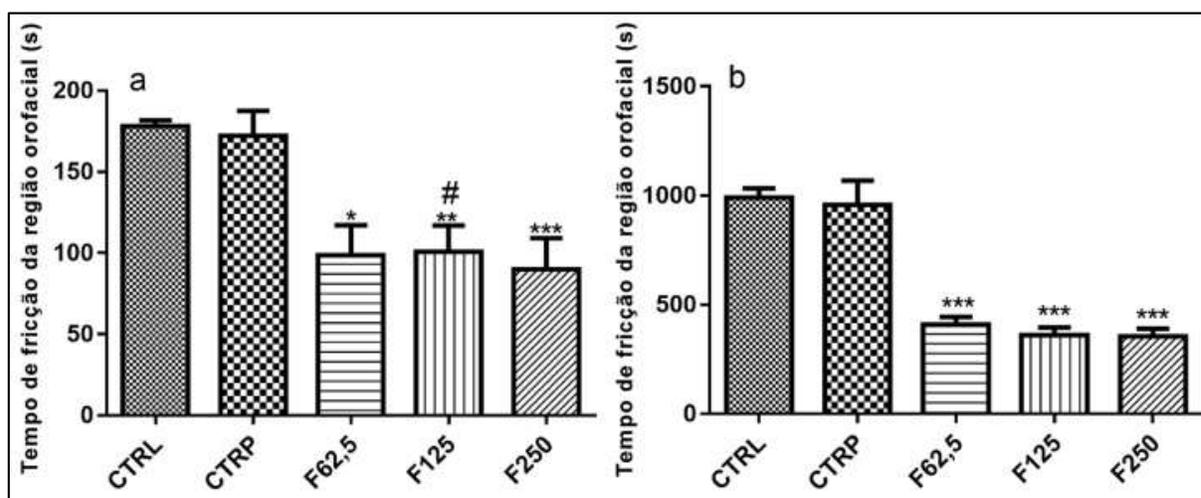


Figura 3 - Tempo de fricção da região orofacial (s) entre 0 a 5 minutos (a) e entre 15 a 40 minutos (b) após a administração da formalina orofacial. As barras representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. Diferença significativa (one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey) com CTRL e CTRP ($*p < 0,01$) e ($***p < 0,001$). Diferença significativa com o CTRL (# $p < 0,001$) e CTRP ($**p < 0,01$). Os grupos CTRL (controle negativo), gel desenvolvido com apenas excipientes farmacêuticos; CTRP (controle positivo), benzocaína a 20%; F62,5, gel de APM na proporção de 62,5mg/Kg; F125, gel de APM na proporção de 125mg/Kg e F250, gel de APM na proporção de 250mg/Kg.

No teste do Rota-rod nenhum dos tratamentos (grupos CTRL, CTRP, F62,5, F125, F250 e EHAPM250) causou alteração na atividade motora dos animais (Figura 4). A análise do tempo de permanência na barra, até a primeira queda ou até o tempo limite (120s) mostrou que no grupo CTRL dois animais caíram da barra giratória do Rota Road em 72s e 61s, respectivamente. Enquanto no CTRP e F62,5 um camundongo caiu em 10s e 89s, nessa ordem. No F125, F250 e EHAPM250 os animais não caíram do aparelho.

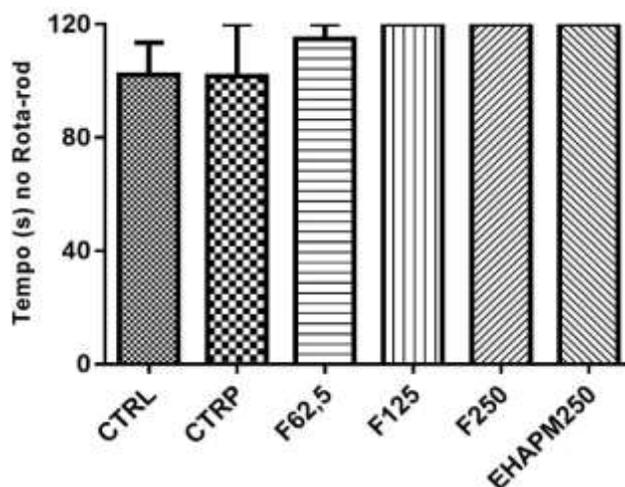


Figura 4 - Tempo (s) de permanência no Rota-rod até a primeira queda do animal. As barras representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey). Os grupos **CTRL** (controle negativo), gel desenvolvido com apenas os excipientes farmacêuticos; **CTRP** (controle positivo), Benzocaína a 20%; **F62,5**, gel de APM na proporção de 62,5mg/kg; **F125**, gel de APM na proporção de 125mg/kg; **F250**, gel de APM na proporção de 250mg/kg; **EHAPM250**, extrato hidroetanólico de *A. pyrifolium* com 250mg/kg diluído em solução fisiológica.

No teste de bloqueio do nervo ciático (Figura 5) observou-se que o extrato de APM apresentou importante atividade anestésica, principalmente na concentração 62,5mg/mL (EHAPM62,5), a qual que bloqueou o nervo da pata esquerda do camundongo por até 20 minutos. Esse resultado foi um pouco superior ao observado com a lidocaína (CTRAP, 10 minutos), anestésico utilizado em procedimentos odontológico e as demais concentrações 31,25 mg/mL (EHAPM31,25), 15,62 mg/mL (EHAPM15,62) e 7,81mg/mL (EHAPM3,46). Todos os animais recuperaram completamente o movimento da pata injetada após 25 minutos, caracterizando um bloqueio reversível.

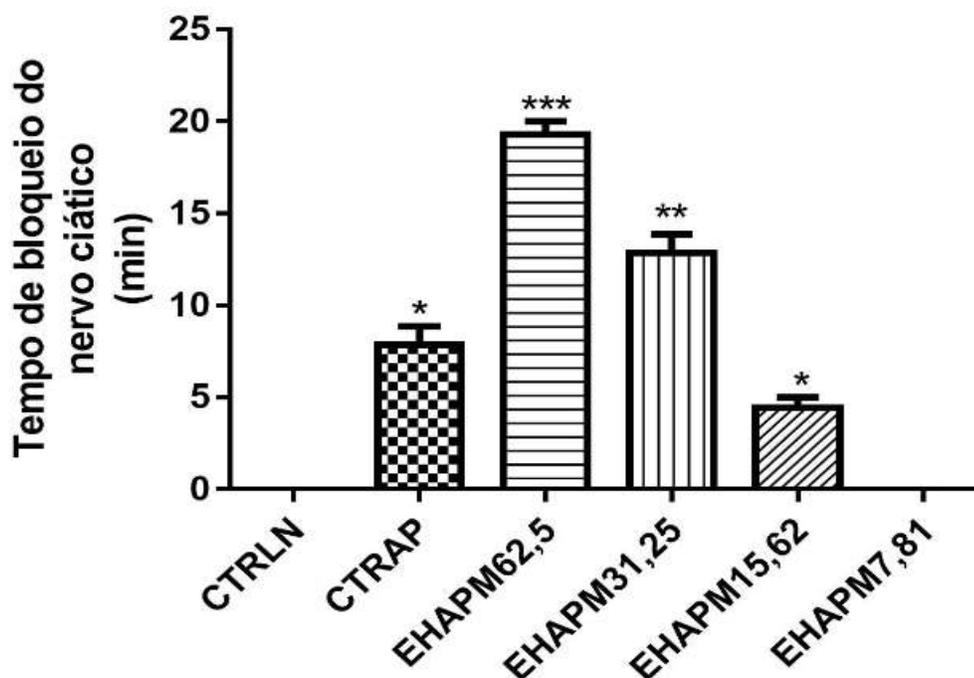


Figura 5 - Tempo de Bloqueio do nervo ciático (min) em camundongos (n=7). Diferença significativa (kruskal Wallis) com CTRLN e EHAPM3,125 ($*p < 0,001$). Diferença significativa com CTRLN, EHAPM10,4 e EHAPM3,125 ($**p < 0,001$). Diferença significativa com CTRLN, CTRAP, EHAPM31,25, EHAPM10,4 e EHAPM3,125 ($***p < 0,001$). **CTRAP** (controle positivo), lidocaína 5mg/mL; **CTRLN** (controle negativo), salina fisiológica; **EHAPM62,5**, **EHAPM31,25**, **EHAPM15,62** e **EHAPM7,81**, extrato hidroetanólico das cascas de APM nas concentrações de 62,5, 31,25, 10,4, e 3,46.

No teste térmico operante de avaliação da dor orofacial observou-se atividade antinociceptiva do gel de APM, principalmente no grupo T125, nos 15 minutos iniciais de observação em relação aos grupos CTRL e CTRP. O grupo F250 apresentou atividade antinociceptiva significativa nos 5 minutos iniciais comparado aos grupos CTRL e F62,5. O tratamento com menor concentração T62,5 não apresentou efeito antinociceptivo comparado aos demais grupos (figura 6).

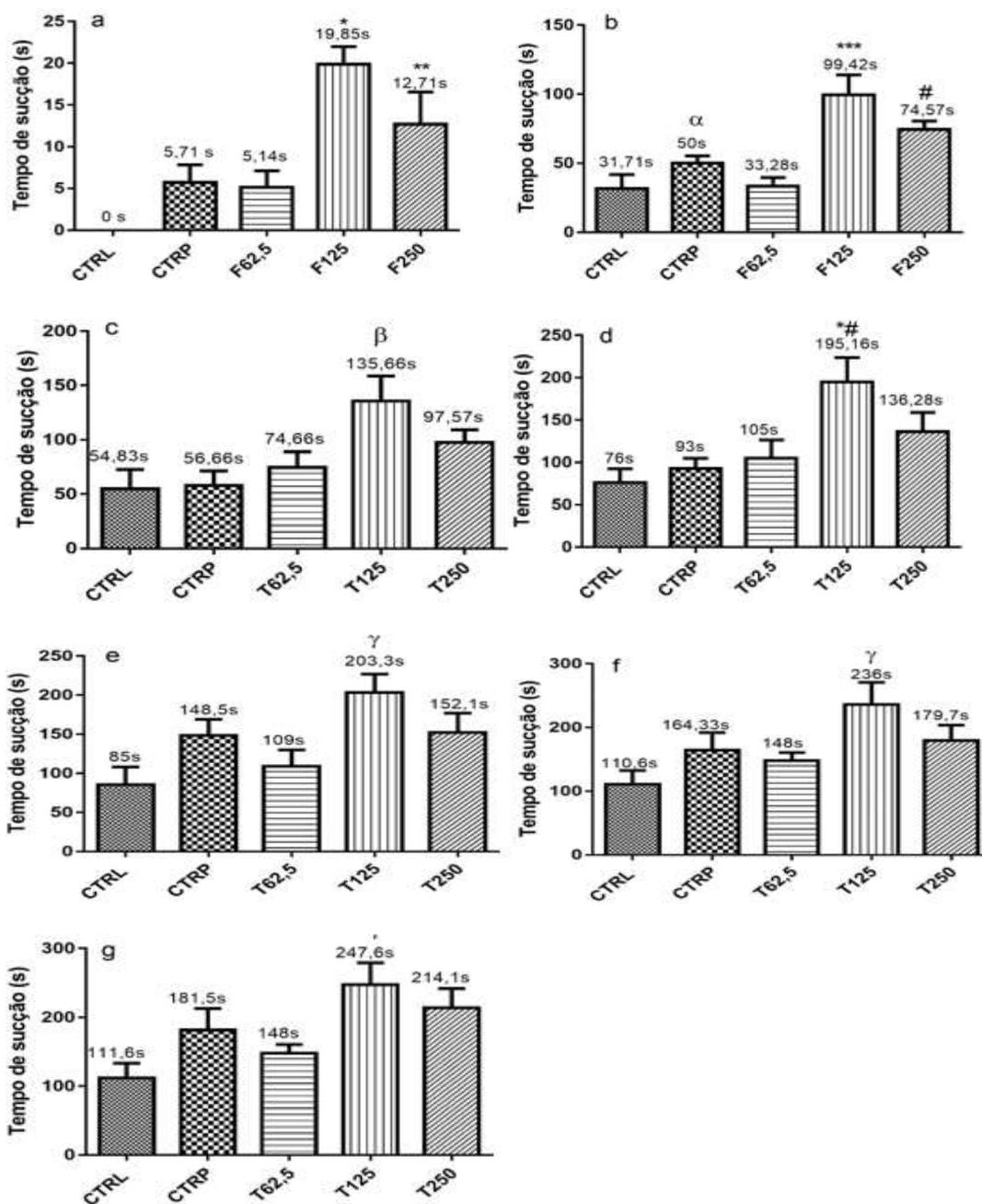


Figura 6 - Tempo de sucção dos camundongos nos grupos CTRL, CTRP, T62,5, T125 e T250 nos tempos de 1 (a), 5 (b), 10 (c), 15 (d), 20 (e), 25 (f) e 30 (g) minutos após a inserção do animal na caixa de acrílico. Diferença significativa com CTRL ($*p < 0,001$), CTRP e T62,5 ($*p < 0,01$). Diferença significativa com CTRL ($**p < 0,01$). Diferença significativa com CTRL, CTRP e T62,5 ($***p < 0,001$). Diferença significativa com CTRL e T62,5 ($\#p < 0,001$). Diferença significativa com CTRL ($\alpha p < 0,001$). Diferença significativa com CTRL e CTRP ($\beta p < 0,05$). Diferença significativa com CTRL ($*\#p < 0,01$), CTRP e T62,5 ($*\#p < 0,05$). Diferença significativa com CTRL ($\gamma p < 0,05$)

DISCUSSÃO

Neste estudo, observa-se uma provável atividade anestésica e analgésica do gel de APM, principalmente nas concentrações em F125 e F250, provavelmente decorrente de alcalóides indólicos²⁵, responsável pela defesa desta planta contra predadores, e possivelmente responsável por seus efeitos farmacológicos²⁶. Pereira et al. (2007)²⁷ realizaram um levantamento de cerca de 247 alcalóides indólicos isolados do gênero *Aspidosperma*, enquanto Gilbert et al. (1960)²⁸ isolou na APM a pirifolina e a pirifolidina, confirmados por Craveiro, Matos e Serrur (1983)²⁹ que descreveram também a existência da aspidofilina e aspidospermina. Assim, o extrato de APM possivelmente apresente alcaloides com atividades anestésicas e/ou analgésicas.

Os resultados do teste rota rod sugerem que a antinocicepção do extrato pode não está relacionada com uma atividade inibitória sobre componentes centrais, parece não exercer ação depressora significativa sobre o sistema nervoso central dos animais, mas sendo possível que tal efeito deva-se a uma ação periférica, conforme descrito por Quintans et al. (2014)¹⁵ e Lima-Saraiva et al (2014).³⁰ Observa-se principalmente nos grupos F125 e F250 a inibição da fase neurogênica (1ª fase), no qual o gel desenvolvido assemelha-se a drogas como morfina e dipirona, que atuam sobre um ou mais sistemas modulares da dor neurogênica, enquanto a inibição da fase inflamatória (2ª fase), podem atuar sobre uma ou mais componentes da resposta inflamatória, reduzindo a sensibilização das terminações nociceptivas periféricas³¹. Charles e Argoff³² relatam a importância dos analgésicos tópicos por apresentar efeitos colaterais mínimos e boa eficácia quando comparado aos analgésicos administrados por via oral. Araújo et al (2018)³³ evidencia que as espécies de *Aspidospermas* podem ser utilizadas para várias enfermidades, no entanto existem ainda poucos estudos farmacológicos descrito para APM.

O extrato de APM apresentou atividade anestésica nos grupos EHAPM62,5, EHAPM31,25 e EHAPM10,4, que possivelmente bloqueiem reversivelmente os canais de Na⁺ que são responsáveis pela iniciação e propagação dos potenciais de ação das células excitáveis do sistema nervoso periférico³⁴, no nervo ciático.²¹ O grupo A62,5 apresenta um tempo de bloqueio do nervo ciático superior a lidocaína, o que pode favorecer o desenvolvimento de novos anestésicos, conforme ocorreu com o planta *Erythroxylum coca*, que isolou a cocaína, desenvolvendo o primeiro anestésico local.⁴

Observa-se nos grupos F125 e F250 uma atividade antinociceptiva, que pode-se sugerir um possível efeito anestésico na região orofacial, com bloqueio reversível das ramificações do nervo

trigêmeo, nervos maxilares e mandibulares²³, que podem estar relacionado com a inibição do influxo de Na⁺, inibindo a despolarização da fibra nervosa, bloqueando a transmissão do impulso nervoso³⁴. Nelbert et al. (2008)²⁴ caracterizaram a dor orofacial em camundongos, estudando o TRPV1 no comportamento operante, com intuito de favorecer desenvolvimento de novos tratamentos.

Freitas-Blanco et al. (2016)³⁵ desenvolveu filme mucoadesivo com extrato de *Acmella oleracea* para anestesia tópica bucal, ressalta a necessidade de desenvolver novos anestésicos tópicos que possam substituir a anestesia infiltrativa que segundo Davoudi et al. (2016)³⁶, induzem medo e ansiedade em pacientes favorecendo o adiamento e até a rejeição do tratamento. A comprovação da atividade anestésica do extrato de APM associada a permeação no lábio e pele (orofacial) dos grupos F62,5, F125 e F250, podem talvez substituir em alguns procedimentos odontológicos, as anestésias infiltrativas, favorecendo uma melhor qualidade de vida ao paciente.

CONCLUSÃO

O extrato de APM apresentou uma atividade anestésica na proporção de 62,5mg/kg (F62,5) superior a lidocaína (5mg/mL) (CTRAP) no nervo ciático do camundongo, que poderá favorecer o desenvolvimento de novos anestésicos tópicos e injetáveis. O extrato e o gel desenvolvido com APM não alteram a coordenação motora do camundongo, além da formulação apresentar um excelente efeito antinociceptivo, decorrentes da sua ação anestésicas e analgésicas, principalmente nas proporções de 125 e 250mg/kg que podem favorecer sua utilização na clínica odontológica.

REFERÊNCIA

1. Martínez CC, Gómez MD, Oh MS. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. *Pharm Biol* 2017; 55:1992-1998.
2. Franz-Montan M, Ribeiro LNM, Volpato MC, Cereda CMS, Groppo FC, Tofoli GR, De Araújo DR, Santi P, De Paula E. Recent advances and perspectives in topical oral anesthesia. *Expert Opin Drug Deliv* 2017;14:673-684.
3. Ogle OE, Mahjoub I G. Local anesthesia: agents, techniques, and complications. *Dent Clin North Am* 2012;56:133-148
4. Tsuchiya, H. Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals with Anesthetic Activity. *Molecules* 2017;22:e1369.

5. Koller C. The sub-conjunctival application of cocaine in eye operations. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 1892;6:421-424.
6. Lathwal G, Pandit IK, Gugnani N, Gupta M. Efficacy of Different Precooling Agents and Topical Anesthetics on the Pain Perception during Intraoral Injection: A Comparative Clinical Study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2015;8:119-122.
7. Ribeiro LN, Franz-Montan M, Breitzkreitz MC, Alcântara AC, Castro SR, Guilherme VA, Barbosa RM, De Paula E. Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2016;93:192-202.
8. Agarwal N, Dhawan J, Kumar D, Anand A, Tangri K. Effectiveness of Two Topical Anaesthetic Agents used along with Audio Visual Aids in Paediatric Dental Patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2017;11:ZC20-ZC83.
9. Gondim DGA, Montagner AM, Pita-Neto IC, Bringel RJS, Sandrini FAL, Moreno EFC, Sousa AM, Correia AB. Análise Comparativa da Eficácia da Administração Tópica de Benzocaína e EMLA[®] na Dor Oral e Sensibilidade Tátil. *International Journal of Dentistry* 2018;2018:1-5.
10. Messiaes DMS. Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba.
11. Rodrigues JVM. Desenvolvimento de uma solução oral com atividade analgésica a partir de extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba.
12. Clavelou P, Pajot J, Dallel R, Raboisson P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neuroscience Letters* 1989;103:349-353.
13. Luccarini P, Childeric A, Gaydier AM, Voisin D, Dallel R. The Orofacial Formalin Test in the Mouse: A Behavioral Model for Studying Physiology and Modulation of Trigeminal Nociception. *The Journal of Pain* 2006; 7:908-914.
14. Shumilov M, Bercovich R, Duchi S, Aimbinder D, Touitou E. Ibuprofen transdermal ethosomal gel: characterization and efficiency in animal models. *J Biomed Nanotechnol* 2010;6:569-576.
15. Quintans JSS, Costa EV, Tavares JF, Souza TT, Araújo SS, Estevam CS, Barison A, Cabral AGS, Silva MS, Serafini MR, Quintans-júnior LJ. Phytochemical study and antinociceptive effect of the hexanic extract of leaves from *Combretum duarceanum* and friedelin, a triterpene isolated from the hexanic extract, in orofacial nociceptive protocols. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2014;24:60-66.

16. Quintans-júnior LJ, Melo MS, Sousa DP, Araújo AA, Onofre ACS, Gelain DP, Gonçalves JCR, Araújo DAM. Antinociceptive Effects of Citronellal in Formalin-, Capsaicin-, and Glutamate-Induced Orofacial Nociception in Rodents and Its Action on Nerve Excitability. *Journal of Orofacial Pain* 2010;24:305-312.
17. Santana MF, Quintans-júnior LJ, Cavalcanti SCH, Oliveira MGB, Guimarães AG, Cunha ES, Melo MS, Santos MRV, Araújo AAS, Bonjardim LR. P-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2011;21:1138-1143.
18. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc* 1957; 46:208-209.
19. Santos PL, Araújo AA, Quintans JS, Oliveira MG, Brito RG, Serafini MR, Menezes PP, Santos MR, Alves PB, De Lucca Júnior W, Blank AF, La Rocca V, Almeida RN, Quintans-júnior LJ. Preparation, Characterization, and Pharmacological Activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) Leaf Essential Oil of β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015:1-12.
20. Wang Y, Wei Y, Oguntayo S, Wilkins W, Arun P, Valiyaveetil M, Song J, Long JB, Nambiar MP. Tightly coupled repetitive blast-induced traumatic brain injury: development and characterization in mice. *J Neurotrauma* 2011;28:2171-2183.
21. Leszczynska K, Kau ST. A Sciatic Nerve Blockade Method to Differentiate Drug-Induced Local Anesthesia From Neuromuscular Blockade in Mice. *JPM* 1992;27:85-93.
22. Lim TK, Macleod BA, Ries CR, Schwarz SK, Stephan KW. The Quaternary Lidocaine Derivative, QX-314, Produces Long-lasting Local Anesthesia in Animal Models In Vivo. *Anesthesiology* 2007; 107: 305-311.
23. Neubert JK, Widmer CG, Malphurs W, Rossi HL, Vierck JRCJ, Caudle RM. Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. *PAIN* 2005;116:386-395.
24. Neubert JK, King C, Malphurs W, Wong F, Weaver JP, Jenkins AC, Rossi HL, Caudle RM. Characterization of mouse orofacial pain and the effects of lesioning TRPV1-expressing neurons on operant behavior. *Mol Pain* 2008; 4: 43.
25. Jácome RLRP, Souza RA, Oliveira AB. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-Pereira". *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2003;13:39-41.
26. Oliveira VB, Freitas MSM, Mathias L, Braz-Filho R, Vieira IJC. Biological activity and indole alkaloid of the genus *Aspidosperma* (Apocynaceae): a review. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2009;11:92-99.

27. Pereira MM, Jácome RLRP, Alcântara AFC, Alves RB, Raslan DS. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Química Nova* 2007;30:970-983.
28. Gilbert B, Antonaccio LD, Archer AAP, Djerassi C. Alkaloid studies. XXIII. Isolation of four new *Aspidosperma* alkaloids-cylindrocarpine, refractine, pyrifoline, and pyrifolidine. *Experientia* 1960;16:61-62.
29. Craveiro AA, Matos FJA, Serur LM. Alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. *Phytochemistry* 1983;22:1526-1528.
30. Lima-Saraiva SGR, Silva J, Branco CRC, Branco A, Amorim ELC, Almeida JRGS. Efeito antinociceptivo do *Encholirium spectabile*: uma Bromeliaceae do bioma caatinga brasileiro. *Pharmacogn Mag* 2014;10:s655-s660.
31. Barkim RL. The Pharmacology of Topical Analgesics. *Postgraduate Medicine* 2013; 125: 7-18.
32. Charles E, Argoff MD. Topical Analgesics in the Management of Acute and Chronic Pain Charles. *Mayo Clin Proc* 2013;88:195-205.
33. Araújo DP, Nogueira PCN, Santos ADC, Costa, RO, De Lucena JD, Gadelha-Filho JCV, Lima FAV, Neves KRT, Leal LKAM, Silveira ER, Viana GSB. *Aspidosperma pyrifolium* Mart: neuroprotective, antioxidant and anti-inflammatory effects in a Parkinson's disease model in rats. *J Pharm Pharmacol* 2018;70:787-796.
34. Kumar M, Batra R, Chopra S, Verma G, Aggarwal A, Garg A. Role of alkalization in enhancing efficacy of the local anesthetic – a clinical study. *Indian Journal of Dental Sciences* 2015;7:24-27.
35. Freitas-Blanco VS, Franz-Montan M, Groppo FC, Carvalho JE, Figueira GN, Serpe L, Sousa IMO, Damasio VAG, Yamane LT, Paula E, Rodrigues RAF. Desenvolvimento e avaliação de um novo filme mucoadesivo contendo extrato de *Acmella oleracea* para anestesia tópica bucal com mucosa 2016;14:1-18.
36. Davoudi A, Rismanchian M, Akhavan A, Nosouhian S, Bajoghli F, Haghighat A, Arbabzadeh F, Samimi P, Fiez A, Shadmehr E, Tabari K, Jahadi S. A brief review on the efficacy of different possible and non-pharmacological techniques in eliminating discomfort of local anesthesia injection during dental procedures. *Anesthesia, Essays and Researches* 2016;10: 13-16.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato de APM apresentou compatibilidade com os excipientes farmacêuticos carbopol, propilenoglicol e trietanolamina, utilizados no desenvolvimento do gel bucal desta planta. Esse extrato apresentou uma atividade anestésica na proporção de 62,5mg/kg superior a lidocaína (5mg/mL) no nervo ciático do camundongo, no qual poderá favorecer o desenvolvimento de novos anestésicos tópicos e injetáveis. O extrato e o gel desenvolvido com APM não alteram a coordenação motora do camundongo, além da formulação apresentar excelente efeito antinociceptivo, decorrentes da sua ação anestésicas e analgésicas, principalmente nas proporções de 125 e 250mg/kg que podem favorecer sua utilização na clínica odontológica.

REFERÊNCIAS

- ABT, E. Topical anesthetics are more effective in diminishing pain from needle stick insertion alone compared to reducing pain from insertion with anesthetic injection. *J Evid Based Dent Pract*, v. 10, n. 3, p. 160-161, 2010.
- AGARWAL, N.; DHAWAN, J.; KUMAR, D.; ANAND, A.; TANGRI, K. Effectiveness of Two Topical Anaesthetic Agents used along with Audio Visual Aids in Paediatric Dental Patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 11, n. 1, p. ZC80-ZC83, 2017.
- AGRA, M. F.; BARACHO, G.S.; SILVA, N.K.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 383–395, 2007a.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, p. 114–140, 2007b
- ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D.G.; LINGHTFOOT, D.A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants (Basel)*, v.6, p.42, 2017.
- AMIN, S. P.; GOLDBERG, D. J. Topical anesthetics for cosmetic and laser dermatology. *J Drugs Dermatol*, v. 4, n. 4, p. 455-561, 2005.
- ARAÚJO, D. P.; NOGUEIRA, P. C. N.; SANTOS, A. D. C.; COSTA, R. O.; DE LUCENA, J. D.; GADELHA-FILHO, J. C. V.; LIMA, F. A. V.; NEVES, K. R. T.; LEAL, L. K. A. M.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. B. *Aspidosperma pyriforme* Mart: neuroprotective, antioxidant and anti-inflammatory effects in a Parkinson's disease model in rats. *J Pharm Pharmacol*, v. 70, n. 6, p. 787-796, 2018.
- ARAÚJO JÚNIOR, J. X.; ANTHEAUME, C.; TRINDADE, R. C. P.; SCHMITT, M.; BOURGUIGNON, J. J.; SANT'ANA, A. E. G. Isolation and characterisation of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyriforme*. *Phytochemistry Reviews*, v. 6, p. 183-188, 2007.
- ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.M.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, v.33, p. 1582-1614, 2015.
- BOHANEČ S, PETERKA TR, BLAŽIČ P, JUREČIČ R, GRMAŠ J, KRIVEC A, ZAKRAJŠEK J. Using different experimental designs in drug-excipient compatibility studies during the preformulation development of a stable solid dosage formulation. *Acta Chim Slov*, v. 57, n. 4, p. 895-903, 2010.

BARKIN, R. L. The Pharmacology of Topical Analgesic. Postgraduate Medicine, v.125, n.1, p. 7-18, 2013.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. 3ª Edição Fortaleza, p. 407-540p, 1976.

CARTAXO, S.L., SOUZA, M.M., DE ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. Journal of Ethnopharmacology, v, 131, p. 326–342, 2010.

CHARLES, E.; ARGOFF, M. D. Topical Analgesics in the Management of Acute and Chronic Pain Charles. Mayo Clin Proc, v. 88, n. 2, p. 195-205, 2013.

CHAVES, T. P. ; FERNANDES, F. H. A. ; SANTANA, C. P. ; SANTOS, J. S.; MEDEIROS, F. D. ; FELISMINO, D. C. ; SANTOS, V. L. ; CATÃO, R. M. R. ; COUTINHO, H. D. M. ; MEDEIROS, A. C. D. Evaluation of the Interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz Extract and Antimicrobials Using Biological and Analytical Models. Plos One, v. 11, p. 1-23, 2016.

CHIDIAC, E.J.; KADDOU, R.N.; FULEIHAN, S.F. Mandragora: Anesthetic of the ancients. Anesth. Analg, v.115, p.1437–1441, 2012.

CLAVELOU, P.; PAJOT, J.; DALLEL, R.; RABOISSON, P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. Neuroscience Letters, v.103, p. 349-353, 1989.

CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; SERUR, L.M. Alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. Phytochemistry. v. 22, n. 6, p. 1526-1528, 1983.

CRUZ MARTÍNEZ, C. C.; GÓMEZ, M. D.;², OH, M. S. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. Pharm Biol, v. 55, n. 1, p. 1992-1998, 2017.

DAVOUDI, A.; RISMANCHIAN, M.; AKHAVAN, A.; NOSOUHIAN, S.; BAJOGHLI, F.; HAGHIGHAT, A.; ARBABZADEH, F.; SAMIMI, P.; FIEZ, A.; SHADMEHR, E.; TABARI, K.; JAHADI, S. Abrief review on the efficacy of different possible and non-pharmacological techniques in eliminating discomfort o flocal anesthesia injection during dental procedures. Anesthesia, Essays and Researches, v. 10, n. 1, p. 13-16, 2016.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

Davoudi A, Rismanchian M, Akhavan A, et al. (2016) A brief review on the efficacy of different possible and non-pharmacological techniques in eliminating discomfort of local anesthesia injection during dental procedures. Anesthesia, Essays and Researches 10, 1 3 –6.

FARIA, F. A. C.; MARZOLA, C. Farmacologia dos anestésicos locais – considerações gerais. BCI, v. 8. n. 29, p. 19-30, 2001.

FERNANDES, F. H.; SANTANA, C. P.; SANTOS, R. L.; CORREIRA, L. P.; CONCEIÇÃO, M. M.; MACÊDO, R. O.; MEDEIROS, A. C. D. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. J. Therm. Anal. Calorim, v.113, p. 443-447, 2013.

FERNANDES, F. H. A. ; ALMEIDA, V. E. ; MEDEIROS, F. D. ; SILVA, P. C. D.; SIMÕES, M. O. S.; VERÁS, G.; MEDEIROS, A. C. D. Evaluation of compatibility between *Schinopsis brasiliensis* Engler extract and pharmaceutical excipients using analytical techniques associated with chemometric tools. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 123, p. 2531-2542, 2016.

FOZZARD, H.A.; LEE, P.J.; LIPKIND, G.M. Mechanism of local anesthetic drug action on voltage-gated sodium channels. Curr. Pharm, V.11, P. 2671–2686, 2005.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO JÚNIOR, A. A.; COELHO, M. A. N. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. BioScience, v.62, n. 1, p. 39-45, 2012.

FRANZ-MONTAN, M.; RIBEIRO, L.N.M; GROppo, F.C.; TOFOLI, G.R.; DE ARAÚJO, DR.; SANTI, P.; PADULA, C.; DEPAULA, E. Recent advances and perspectives in topical oral anesthesia. Expert Opin Drug Deliv, v.14, p. 673-684, 2017.

FRANZ-MONTAN, M.; RIBEIRO, L. N. M.; VOLPATO, M. C.; CEREDA, C. M. S.; GROppo, F. C.; TOFOLI, G. R.; DE ARAÚJO, D. R.; SANTI, P.; DE PAULA, E. Recent advances and perspectives in topical oral anesthesia. Expert Opin Drug Deliv. v. 14, n. 5, p. 673-684, 2017.

FREITAS-BLANCO, V. S.; FRANZ-MONTAN, M.; GROppo, F. C.; CARVALHO, J. E.; FIGUEIRA, G. N.; SERPE, L.; SOUSA, I. M. O.; DAMASIO, V. A. G.; YAMANE, L. T.; PAULA, E.; RODRIGUES, R. A. F. Desenvolvimento e avaliação de um novo filme mucoadesivo contendo extrato de *Acmella oleracea* para anestesia tópica bucal com mucosa, v. 14, p. 1-18, 2016.

FROES, G. C.; OTTONI, F. D. A.; GONTIJO, G. Topical Anesthetics. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, v. 2, n. 2, p. 111-116, 2010.

GALLO, L.; RAMÍREZ-RIGO, M.V.; WILSON, E.; PINÃ, J.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V. Spray-Dried Cascara Sagrada extract for direct compression: tablet formulation and a simple HPLC method for tablet performance evaluation. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, v.4, p.1360-1370, 2013.

GILBERT, B.; ANTONACCIO, L.D.; ARCHER, A.A.P.G.; DJERASSI, C. Alkaloid studies. XXIII. Isolation of four new aspidosperma alkaloids-cylindrocarpine, refractine, pyrifoline, and pyrifolidine. *Experientia*, v. 16, p. 61-62, 1960.

GONDIM, D. G. A.; MONTAGNER, A. M.; PITA-NETO, I. C.; BRINGEL, R. J. S.; SANDRINI, F. A. L.; MORENO, E. F. C.; SOUSA, A. M.; CORREIA, A. B. Análise Comparativa da Eficácia da Administração Tópica de Benzocaína e EMLA[®] na Dor Oral e Sensibilidade Tátil. *International Journal of Dentistry*, v. 2018, p. 1-5, 2018.

Harreld TK, Fowler S, Drum M, Reader A, Nusstein J, Beck M (2015) Efficacy of a buffered 4% lidocaine formulation for incision and drainage: a prospective, randomized, double-blind study. *Journal of Endodontics* 41, 1583–8

HARRELD, T.K.; FOWLER, S.; DRUM, M.; READER, A.; NUSSETEIN, J.; BECK, M. Efficacy of a buffered 4% lidocaine formulation for incision and drainage: a prospective, randomized, double-blind study. *Journal of Endodontics*, v.41, p. 1583–8, 2015.

JÁCOME, R.L.P.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; WAGNER, H. Chemical constituents and chromatographic profile of the stem bark of *Aspidosperma parvifolium* A. DC ("pau-pereira). *Quim. Nova*, v. 27, p.897-900, 2004.

JÁCOME, R.L.R.P.; SOUZA, R.A., OLIVEIRA, A.B. Comparação cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico "Pau-Pereira". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13, n.1, p. 39 – 41, 2003.

JULIO, T. A.; ZÂMARA, I. F.; GARCIA, J. S.; TREVISAN, M.G. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC–UV, *J. Therm. Anal. Calorim.*, v. 111, p. 2037-2044, 2013.

KHACHANI, M.H.; EL HAMIDI, A.; HALIM, M.; ARSALANE, S. Non isothermal kinetic and thermodynamic studies of the dehydroxylation process of synthetic calcium hydroxide Ca (OH) 2. *J Mater Environ Sci*, v. 5, p. 615-624, 2014.

KHODJA, N.K.; BOULEKBACHE, L.; CHEGDANI, F.; DAHMANI, K.; BENNIS, F.; MADANI, K. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds and essential oils from *Calamintha nepeta* L. *J Complement Integr Med*, v. 24, p. 1-12, 2018.

KOAY, J.; ORENGO, I. Application of local anesthetics in dermatologic surgery. *Dermatol Surg*, v. 28, n. 2, p. 143-148, 2002.

KOLLER, C. The sub-conjunctival application of cocaine in eye operations. *Trans. Am. Ophthalmol.* v.6, p. 421–424, 1892.

KUMAR, M.; BATRA, R.; CHOPRA, S.; VERMA, G.; AGGARWAL, A.; GARG, A. Role of alkalization in enhancing efficacy of the local anesthetic – a clinical study. *Indian Journal of Dental Sciences*, v.7, p. 24-27, 2015.

KUMAR, V.; SHAH, R. P.; MALIK, S.; SINGH S. Compatibility of atenolol with excipients: LC–MS/TOF characterization of degradation/interaction products, and mechanisms of their formation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 49, p. 880-888, 2009.

Kumar M, Batra R, Chopra S, Verma G, Aggarwal A, Garg A (2015) Role of alkalization in enhancing efficacy of the local anesthetic – a clinical study. *Indian Journal of Dental Sciences* 7, 2 4 –7.

LATHWAL, G.; PANDIT, I. K.; GUGNANI, N.; GUPTA, M. Efficacy of Different Precooling Agents and Topical Anesthetics on the Pain Perception during Intraoral Injection: A Comparative Clinical Study. *Int J Clin Pediatr Dent*, v. 8, n. 2, p. 119-122, 2015.

LEMOS, J.R.; ZAPPI, DC. Distribuição geográfica mundial de plantas lenhosas da Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Brasil. *Rev Bras de Biociência*, v.10, p. 446–456,2012.

LIM, B. S. TONY K. Y.; MACLEOD, M. D. F. R. C. P. C. BERNARD A.; RIES, M. D. P. D. F. R. C. P. C. CRAIG R.; SCHWARZ, M. D. P. D. F. R. C. P. C. STEPHAN K. W. The Quaternary Lidocaine Derivative, QX-314, Produces Long-lasting Local Anesthesia in Animal Models In Vivo *Anesthesiology*, v. 107, n. 2, p. 305-311, 2007.

LIMA-SARAIVA , S. G. R.; SILVA, J. C.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; AMORIM, E. L. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Efeito antinociceptivo do *Encholirium spectabile* : uma Bromeliaceae do bioma caatinga brasileiro. *Pharmacogn Mag*, v. 10, n. 3, p. 655-660, 2014.

LESZCZYNSKA, K.; KAU, S. T. A Sciatic Nerve Blockade Method to Differentiate Drug-Induced Local Anesthesia From Neuromuscular Blockade in Mice. *JPM*, v. 27, n.2, p. 85-93,1992.

LUCCARINI, P.; CHILDERIC, A.; GAYDIER, A.-M.; VOISIN, D.; DALLEL, R. The Orofacial Formalin Test in the Mouse: A Behavioral Model for Studying Physiology and Modulation of Trigeminal Nociception. *The Journal of Pain*, v. 7, n. 12, p. 908-914, 2006.

MARINHO, M. G. V.; SILVA, C. C.; ANDRADE, L. H. C. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, n.2, p.170-182, 2011.

MARTÍNEZ, C. C.; GÓMEZ, M. D.; OH, M. S. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. *Pharm Biol*, v. 55, n. 1, p. 1992-1998, 2017.

MESSIADES, D. M. S. Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba.

MITAINE, A. C.; MESBAH, K.; RICHARD, B.; PETERMANN, C.; ARRAZOLA, S.; MORETTI, C.; ZÉCHES-HANROT, M.; MEN-OLIVIER, L.L. Alkaloids from *Aspidosperma* species from Bolivia. *Planta Med*, v. 62, p. 458-61, 1996.

NEUBERT, J. K.; ROSSI, H. L.; MALPHURS, W.; VIERCK JR, C. J.; CAUDLE, R. M. Differentiation between capsaicin-induced allodynia and hyperalgesia using a thermal operant assay. *Behav Brain Res*, v. 170, p. 308-315, 2006.

NEUBERT, J. K.; WIDMER, C.G.; MALPHURS, W.; ROSSI, H. L.; VIERCK JR, C. J.; CAUDLE, R. M. Use of a novel thermal operant behavioral assay for characterization of orofacial pain sensitivity. *Pain*, v. 116, p. 386-395, 2005.

NEUBERT, J. K.; KING, C.; MALPHURS, W.; WONG, F.; WEAVER, J. P.; JENKINS, A. C.; ROSSI, H. L.; CAUDLE, R. M. Characterization of mouse orofacial pain and the effects of lesioning TRPV1-expressing neurons on operant behavior. *Mol Pain*, v. 4, n., p. 43, 2008.

NETO, F. R. G.; ALMEIDA, G. S.S. A.; JESUS, N. G.; FONSECA, M. R. Estudo Etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Sisal no município de Catu, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.16, n.4, p.856-865, 2014.

OGLE, O.E.; MAHJOUBI, G. Local anesthesia: agents, techniques, and complications. *Dent Clin North Am*, v.56, p.133-148. 2012.

OLIVEIRA, V.B.; ARAÚJO, R.L.B.; EIDENBERGER, T.; BRANDÃO, M.G.L. Composição química e atividades inibitórias sobre dipeptidil peptidase IV e lipase pancreática de duas espécies subutilizadas do Cerrado: *Oxalis cordata* A.St.-Hil. e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. *Alimentos Res Int*, v.105, p.989-995, 2018.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.11, n.1, p.92-99, 2009.

PANI, N. R.; NATH, L. K.; ACHARYA, S.; BHUNIYA, B. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients, *J. Therm. Anal. Calorim.*, v. 108, p. 219-226, 2012.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, R.L.R.P.; ALCÂNTARA, A.F.C.; ALVES, R.B.; RASLAN, D.S. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Química Nova*, v. 30, n.4, p.970-983, 2007.

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F.; ORTEGA, J. M.; DO AMARAL, A. M.; TÓTOLA, M. R.; HIRSCH, P. R.; ROSADO, A. S.; GÓES-NETO, A.; DA COSTA S. A. L.; ROSA, C. A.; MORAIS, D. K.; ANDREOTE, F. D.; DUARTE, G. F.; DE MELO, I. S.; SELDIN,

L.; LAMBAIS, M. R.; HUNGRIA, M.; PEIXOTO, R. S.; KRUGER, R. H.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, V. Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity--challenges and prospects. *Microb Ecol*, v. 67, n. 2, p. 237-241, 2014.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MELO, M. S.; SOUSA, D. P.,; ARAÚJO, A. A.; ONOFRE, A. C. S.; GELAIN, D. P.; GONÇALVES, J. C. R.; ARAÚJO, D. A.M. Antinociceptive Effects of Citronellal in Formalin-, Capsaicin-, and Glutamate-Induced Orofacial Nociception in Rode. and Its Action on Nerve Excitability. *Journal of Orofacial Pain*, v. 24, n. 3, p. 305-312, 2010.

QUINTANS, J. S. S.; COSTA, E. V.; TAVARES, J. F.; SOUZA, T. T.; ARAÚJO, S. S.; ESTEVAM, C. S.; BARISON, A.; CABRAL, A. G. S.; SILVA, M. S.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phytochemical study and antinociceptive effect of the hexanic extract of leaves from *Combretum duarteanum* and friedelin, a triterpene isolated from the hexanic extract, in orofacial nociceptive protocols. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 24, p. 60-66, 2014.

RIBEIRO, L. N.; FRANZ-MONTAN, M.; BREITKREITZ, M. C.; ALCÂNTARA, A. C.; CASTRO, S. R.; GUILHERME, V. A.; BARBOSA, R. M.; DE PAULA, E. Nanostructured lipid carriers as robust systems for topical lidocaine-prilocaine release in dentistry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, p. 192-202, 2016

RODRIGUES, J. V. M. Desenvolvimento de uma solução oral com atividade analgésica a partir de extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. Handbook of pharmaceutical excipients. 6th ed. London: Pharmaceutical Press; American Pharmacists Association, 2009.

SANTANA, M. F.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; OLIVEIRA, M. G. B.; GUIMARÃES, A. G.; CUNHA, E. S.; MELO, M. S.; SANTOS, M. R. V.; ARAÚJO, A. A.S.; BONJARDIM, L. R. *P*-Cymene reduces orofacial nociceptive response in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 21, n. 6, p. 1138-1143, 2011.

SANTOS, M. C.; et al. Resgate histórico de um grupo rural de estudos das plantas medicinais: educação em saúde. *Cadernos de Educação FaE/PPGE/UFPel*, vol. 3,n.9 p. 285 - 299, 2011.

SANTOS, P. L.; ARAÚJO, A. A.; QUINTANS, J. S.; OLIVEIRA, M. G.; BRITO, R. G.; SERAFINI, M. R.; MENEZES, P. P.; SANTOS, M. R.; ALVES, P. B.; DE LUCCA JÚNIOR, W.; BLANK, A. F.; LA ROCCA, V.; ALMEIDA, R. N.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Preparation, Characterization, and Pharmacological Activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (Poaceae) Leaf Essential Oil of β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2015, p. 1-12, 2015.

SCHELLENBERG, J.; DRUM, M.; READER, A.; NUSSTEIN, J.; FOWLER, S.; BECK, M. Effect of buffered 4% lidocaine on the success of the inferior alveolar nerve block in patients

with symptomatic irreversible pulpitis: a prospective, randomized, double-blind study. *Journal of Endodontics*, v. 41, p. 791–796, 2015.

SHUMILOV, M.; BERCOVICH, R.; DUCHI, S.; AINBINDER, D.; TOUITOU, E. Ibuprofen transdermal ethosomal gel: characterization and efficiency in animal models. *J Biomed Nanotechnol*, v. 6, n. 5, p. 569-576, 2010.

Schellenberg J, Drum M, Reader A, Nusstein J, Fowler S, Beck M (2015) Effect of buffered 4% lidocaine on the success of the inferior alveolar nerve block in patients with symptomatic irreversible pulpitis: a prospective, randomized, double-blind study. *Journal of Endodontics* 41, 791–6. Shurtz R, Nusstein J, Reader A, Drum M, Fowler S, Beck M (2015) Buffered 4% articaine as a primary buccal infiltration of the mandibular first molar: a prospective, randomized, double-blind study. *Journal of Endodontics* 41, 1403–7.

Schellenberg J, Drum M, Reader A, Nusstein J, Fowler S, Beck M (2015) Effect of buffered 4% lidocaine on the success of the inferior alveolar nerve block in patients with symptomatic irreversible pulpitis: a prospective, randomized, double-blind study. *Journal of Endodontics* 41, 791–6.

SHURTZ, R.; NUSSTEIN, J.; READER, A.; DRUM, M.; FOWLER, S.; BECK, M. Buffered 4% articaine as a primary buccal infiltration of the mandibular first molar: a prospective, randomized, double-blind study. *Journal of Endodontics* v.41, p. 1403–7, 2015.

SILVA, T. S.; FREIRE, E. M. X. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por populações do entorno de uma unidade de conservação da caatinga do Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, Botucatu, v.12, n.4, p.427-435, 2010.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; Niemant, T.A. *Principles of Instrumental Analysis*. 5th ed. Philadelphia: Harcourt Brace & Company, 1998.

TRIBESS, B.; PINTARELLI, G. M.; BINI, L. A.; CAMARGO, A.; FUNEZ, L. A.; DE GASPER, A. L.; ZENI, A. L. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. *J Ethnopharmacol*, v. 164, n. 22, p. 136-146, 2015. TRZECIAK, M. B.; DAS NEVES, M. B.; VINHOLES, P. S.; VILLELA, F. A. Utilização de sementes de espécie soleaginosas para produção de biodiesel. *Inf. Abrantes*, v. 18, p. 30–38, 2008.

TSUCHIYA, H. Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals with Anesthetic Activity. *Molecules*, v. 22, n. 8, p. e1369, 2017.

TSUCHIYA, H.; MIZOGAMI, M. Interaction of local anesthetics with biomembranes consisting of phospholipids and cholesterol: Mechanistic and clinical implications for anesthetic and cardiotoxic effects. *Anesthesiol. Res. Pract*, v.2013, p. 297141, 2013

WANG, Y.; WEI, Y.; OGUNTAYO, S.; WILKINS, W.; ARUN, P.; VALIYAVEETIL, M. ; SONG, J.; LONG, J. B.; NAMBIAR, M. P. Tightly coupled repetitive blast-induced

traumatic brain injury: development and characterization in mice. *J Neurotrauma*, v. 28, n. 10, p. 2171-2183, 2011.

XU, Y.; AL-SALIM, N.; TILLEY, R.D. Synthesis and size dependent reflectance study of water soluble sns nanoparticles. *Nanomaterials*, v. 2, p. 54-64,2012.

ANEXO A Certidão



**Faculdades Nova
Esperança**
De 1964 no futuro



FACULDADES NOVA ESPERANÇA – FACENE/FAMENE
COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS - CEUA FACENE/FAMENE

CERTIDÃO

Com base na Lei 11.794 de 08 de out. de 2008, que regulamenta a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, além dos princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que embasaram sua criação, Obedecendo aos critérios estabelecidos por eles, o Comitê de Ética na Utilização de Animais das Faculdades Nova Esperança, CEUA FACENE/FAMENE, em sua 8ª Reunião ordinária, realizada em 12 de setembro de 2017, resolveu considerar, **APROVADO**, o projeto de pesquisa intitulado “Desenvolvimento de um anestésico tópico bucal com extrato da *aspidosperma pyrifolium* Mart”, protocolo número: 0062.2017.2. Pesquisadores responsáveis: Roniery de Oliveira Costa e profª Ana Cláudia Dantas Medeiros.

Esta certidão não tem validade para fins de publicação do trabalho, certidão para este fim será emitida após a apresentação do relatório final e da conclusão da pesquisa.

João Pessoa, 12 de setembro de 2017



Faculdade Nova Esperança
Maria do Socorro Gadelha Nóbrega
Coordenadora do CEUA - Comitê de Ética
na Utilização de Animais - Faculdade Nova Esperança

Maria do Socorro Gadelha Nóbrega