

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/01/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

GIOVANA MARIA FIORAMONTI CALIXTO

**SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS
MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO BUCAL DE PEPTÍDEO
ANTIGELATINOLÍTICO ASSOCIADOS À TERAPIA FOTODINÂMICA NO
TRATAMENTO DO CÂNCER BUCAL**

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

ARARAQUARA - SP

2017

GIOVANA MARIA FIORAMONTI CALIXTO

**SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS
MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO BUCAL DE PEPTÍDEO
ANTIGELATINOLÍTICO ASSOCIADOS À TERAPIA FOTODINÂMICA NO
TRATAMENTO DO CÂNCER BUCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

ARARAQUARA - SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C154s Calixto, Giovana Maria Fioramonti
Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de peptídeo antigelatinolítico associados à terapia fotodinâmica no tratamento do câncer bucal / Giovana Maria Fioramonti Calixto. -- Araraquara, 2017.
137 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.

1. Nanotecnologia farmacêutica. 2. Sistemas de liberação de fármacos. 3. Cristais líquidos. 4. Administração bucal. 5. Polímeros catiônicos. 6. Mucoadesão. 7. Peptídeos. 8. Câncer bucal. 9. Terapia fotodinâmica. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

GIOVANA MARIA FIORAMONTI CALIXTO

Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de peptídeo antigelatinolítico associados à terapia fotodinâmica no tratamento do câncer bucal

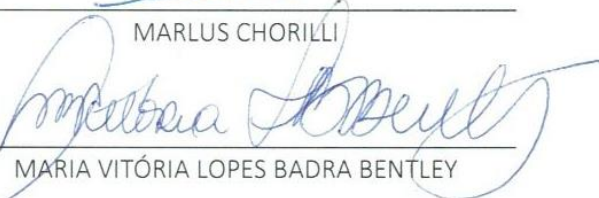
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 27 de janeiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



MARLUS CHORILLI



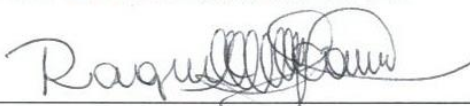
MÁRIA VITÓRIA LOPES BADRA BENTLEY



RENATA FONSECA VIANNA LOPEZ



CARLOTA DE OLIVEIRA RANGEL YAGUI



RAQUEL MANTUANELI SCAREL CAMINAGA

Dedico esse trabalho aos meus pais João e Rosana, aos meus irmãos Carolina e João Gabriel, à minha família e ao meu namorado Iwan Balian.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a minha mãe que me ensinou a ter fé em Deus principalmente nas horas difíceis. Tal fé que me fez ter forças para chegar até aqui e, assim, agradecer enormemente a Deus por tudo.

Essas horas difíceis foram várias, primeiramente, por estar longe da minha amada família: meus pais, avós, tia-avó, irmãos. Mas como ouvi um dia: “É mais valioso uma família presente do que uma família perto”. Por isso, quero agradecer cada um por estarem sempre presentes em minha vida.

Quero agradecer também a uma pessoa que reacendeu minha fé no amor, no companheirismo e que me fez ver flores nos 164 km que nos separa, que me faz aguardar ansiosamente por todos os fins de semana e que sente um orgulho danado de mim. Que durante os meus 93 dias em Portugal, me ajudou a superar todas as caras feias, as saudades e a falta do Brasil. Obrigada, Iwan!

Desafio tão grande quanto escrever a tese, é agradecer quem me orientou a escrever a tese. Eu me lembro que foi em 2010 que conheci o Professor Doutor Marlus Chorilli que sorriu ao tirar uma dúvida minha em uma aula prática da graduação e que ao explicar com tanto gosto, me fez despertar a minha paixão por sistemas líquidos cristalinos. Eu, uma aluna tímida academicamente, nunca imaginava um dia conseguir encontrar um orientador de iniciação científica e ele então segurou minha mão e me explicou o que é a ciência, o que é a linguagem científica e, “de repente”, me vi Mestre em Ciências Farmacêuticas e escrevendo sozinha alguns artigos científicos. Professor, muito obrigada por me orientar! A sua trajetória profissional é minha inspiração.

Agradeço também aos Professores do Laboratório de Farmacotécnica: Palmira, Ana Dóris, Anselmo e Raul (*in memoriam*).

Quero agradecer a todos meus amigos do Laboratório de Farmacotécnica e colaboradores que de alguma forma me ajudaram: Márcia, Roberta, Bruno, Jéssica, Maíra, Aline, Alice, Valéria, Natália, Natália Santos, Eliete, Camila, Josimar, Francesca, Fabiana, Liliane, Fernanda, Karen, Mariana, Margarete, Leonardo, Jovan, Lucas, Patrícia, Matheus, Lilian, Gisela, Ana Luísa, Charlene, Bia, Hilris, Tiago, Gustavo, enfim, a todos! Desculpa-me se me esqueci de alguém!

Quero agradecer especialmente minhas amigas Maísa, Gabriela, Marcela, Carol, Tatiani, Ariani e Paloma pela conexão absurda que temos.

Quero agradecer também minhas amigas portuguesas Diana e Olívia que me ajudaram muito durante meu estágio em Portugal. E também a minha orientadora em Portugal Profa. Fátima Baltazar.

Quero agradecer a Profa. Dra. Carla Raquel Fontana e sua aluna Laura Marise que me ajudaram nos experimentos com TFD e agradecer a Profa Christiane Pienna e a aluna Nicole pelas imensas ajudas nos experimentos com células.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Cleverton Roberto e Profa. Dra. Cristina Kurachi pelas contribuições em meu Exame de Qualificação.

Agradeço ao apoio da FAPESP pela concessão da bolsa no país (Processo: 2013/01565-1) e da bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE Processo: 2016/06337-5).

RESUMO

O câncer bucal é uma doença altamente incidente na população mundial, podendo provocar invalidez, deformidades faciais e morte. O tratamento de escolha é a quimioterapia e radioterapia, que causam vários efeitos adversos como xerostomia, mucosite, perda de cabelo, náusea, dores e vômitos. A administração de moléculas bioativas, como o peptídeo antitumoral CTT1, demonstrou ser um tratamento inovador e eficaz para o câncer bucal. No entanto, peptídeos apresentam baixa biodisponibilidade oral, o que diminui o desempenho clínico do tratamento. Portanto, a sua administração pela via bucal incorporado em sistemas nanoestruturados mucoadesivos precursores de cristais líquidos (SPCL) constituídos por álcool cetílico etoxilado 20 e propoxilado 5, ácido oleico e fase aquosa contendo água (FA), dispersão polimérica de quitosana (FQ), dispersão polimérica de polietilenoimina (FP) ou dispersão de quitosana associada a polietilenoimina (FPQ) surge como uma valiosa estratégia, visto que a mucosa bucal apresenta alta permeabilidade e alta irrigação sanguínea, o que pode aumentar a absorção do CTT1. Ademais, o SPCL possibilita a incorporação concomitante do CTT1 com o fotossensibilizante azul de metileno (AM), permitindo a associação da terapia fotodinâmica (TFD) à terapia peptídica antitumoral, o que pode potencializar o tratamento do câncer bucal. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de SPCL mucoadesivos para administração bucal do peptídeo CTT1, bem como avaliar o emprego da TFD utilizando o AM como fotossensibilizante, na terapia contra o câncer bucal. Os SPCL foram caracterizados por microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS), ensaios de reologia de mucoadesão e de perfil de textura *in vitro*, os quais evidenciaram que todas as formulações agiram como SPCL, pois formaram cristais líquidos após a adição de saliva artificial, sendo que FPQ formou um cristal líquido mais mucoadesivo e estruturado, portanto foi selecionado para a incorporação de CTT1 (FPQ-P) e AM (FPQ-AM). FPQ liberou 8% do CTT1 e 40% do AM em 24 horas, agindo como um sistema de liberação sustentada. O teste de dicroísmo circular demonstrou que o peptídeo CTT1 permaneceu estável após ser incorporado em FPQ. A zimografia evidenciou que o peptídeo CTT1 conseguiu inibir a ação das MMP 2 e 9; no entanto, FPQ-P não inibiu, provavelmente pela baixa taxa de liberação do peptídeo a partir do sistema. Os testes citotóxicos demonstraram que o peptídeo não influencia a viabilidade celular enquanto que os testes fotocitotóxicos *in vitro* parecem demonstrar que o AM incorporado na formulação é promissor para a TFD. Os testes *in vivo* em membrana corioalantóica do embrião da galinha (CAM) mostraram que 10% da formulação FPQ não demonstrou afetar os vasos sanguíneos da CAM. Os testes para avaliar o crescimento tumoral mostraram que o CTT1 diminuiu a formação do tumor e do número dos vasos; no entanto, quando o peptídeo foi adicionado na formulação, essa ação foi menor, o que era esperado uma vez que formulação retarda a liberação do peptídeo em 8h. Os resultados sugerem o potencial do sistema para incorporação do peptídeo CTT1 e do AM objetivando o tratamento do câncer bucal.

Palavras-chave: Nanotecnologia farmacêutica. Sistemas de liberação de fármacos. Cristais líquidos. Administração bucal. Polímeros catiônicos. Mucoadesão. Peptídeos. Câncer bucal. Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Oral cancer is a highly incident disease in the world population, and can cause disability, facial deformities and death. The treatment of choice is chemotherapy and radiotherapy, which cause various adverse effects like xerostomia, mucositis, hair loss, nausea, aches and vomiting. The administration of bioactive molecules, such as the antitumor peptide CTT1, has proven to be an innovative and effective treatment for oral cancer. However, peptides have low oral bioavailability, which decreases the clinical performance of the treatment. Therefore, its administration by the oral route incorporated in liquid crystal precursor (SPCL) mucoadhesive nanostructured systems consisting of ethoxylated ethoxylated 20 and propoxylated cetyl alcohol 5, oleic acid and aqueous phase containing water (FA), polymer dispersion of chitosan (CF), dispersion (FP) or polyethyleneimine-associated chitosan dispersion (FPQ) arises as a valuable strategy, since the buccal mucosa has high permeability and high blood supply, which may increase the uptake of CTT1. In addition, SPCL allows the simultaneous incorporation of CTT1 with the methylene blue photosensitizer (MA), allowing the association of photodynamic therapy (PDT) with antitumor peptide therapy, which may potentiate oral cancer treatment. The objective of this study was to evaluate the potential of mucoadhesive SPCL for buccal administration of the CTT1 peptide, as well as to evaluate the use of PDT using AM as a photosensitizer in oral cancer therapy. SPCL were characterized by polarized light microscopy (MLP), low-angle X-ray scattering (SAXS), in vitro mucoadhesion rheology and texture profile tests, which showed that all formulations acted as SPCL because (FPQ-P) and AM (FPQ-AM) were added to the liquid crystals after the addition of artificial saliva, and FPQ formed a more mucoadhesive and structured liquid crystal. FPQ released 8% of CTT1 and 40% of AM in 24 hours, acting as a sustained release system. The circular dichroism test demonstrated that the CTT1 peptide remained stable after being incorporated into FPQ. Zymography showed that the CTT1 peptide was able to inhibit the action of MMP 2 and 9; However, FPQ-P did not inhibit, probably because of the low rate of release of the peptide from the system. Cytotoxic assays have demonstrated that the peptide does not influence cell viability while in vitro photocytotoxic tests seem to demonstrate that AM incorporated into the formulation is promising for PDT. In vivo chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) tests showed that 10% of the FPQ formulation was not shown to affect CAM blood vessels. Tests to assess tumor growth showed that CTT1 decreased tumor and vessel number formation; However, when the peptide was added to the formulation, this action was lower, which was expected since the formulation slows the release of the peptide in 8h. The results suggest the potential of the system for the incorporation of the CTT1 peptide and AM aiming at the treatment of oral cancer.

Keywords: Pharmaceutical nanotechnology. Drug delivery systems. Liquid crystals. Buccal administration. Cationic polymers. mucoadhesion. Peptides. Oral cancer, Photodynamic therapy

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica (Adaptado de CALIXTO *et al.*, 2016). Após a absorção de luz, o fotossensibilizador (FS) alcança o estado singlete excitado e após o cruzamento intersistema, ele alcança o estado triplete excitado que interage diretamente com biomoléculas, produzindo radicais ou íons radicais através de reações de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons que reagem instantaneamente com o O₂, gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (EROS), os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas. No mecanismo tipo II, obtém-se oxigênio singlete altamente reativo através da transferência de energia do FS no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio.....28
- Figura 2. Representações esquemáticas de fases líquidos cristalinas formadas por compostos anfifílicos em água, sendo lamelar (A), hexagonal (B) e cúbica (C). Adaptado de CALIXTO *et al.*, 2015.30
- Figura 3. Exemplo do diagrama de fase com 54 pontos. O ponto 31 destacado apresenta 30 % de fase aquosa, 30% de fase oleosa e 40% de tensoativo.....36
- Figura 4. Esquema ilustrativo da análise de perfil de textura.....40
- Figura 5. Esquema ilustrativo do teste de mucoadesão *in vitro*.41
- Figura 6. Representação esquemática para avaliação das alterações vasculares da membrana corioalantóica (CAM) de ovos de galinha.51
- Figura 7. Representação esquemática para avaliação do crescimento tumoral utilizando o modelo “*in vivo*” de membrana corioalantóica (CAM) de ovos de galinha.52
- Figura 8. Aspecto visual das formulações classificadas como separação de fases (SF), sistema opaco (SO), sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso transparente (SVT).53
- Figura 9. Classificação visual dos diagramas compostos por Procetyl (PRO), ácido oleico (AO) e (A) água (A), (B) Quitosana (QS), (C) Polietilenoimina (PEI), (D) PEI + QS, onde: Sistema Líquido Transparente (SLT), Sistema Viscoso Transparente (SVT), Sistema Opaco (SO) e Separação de fases (SF).54
- Figura 10. Exemplos de fotomicrografias obtidas pela MLP. As setas vermelhas indicam uma cruz de malta.....57
- Figura 11. Diagramas ternários compostos por Procetyl (PRO), ácido oleico (AO) e (A) água, (B) Quitosana (QS), (C) Polietilenoimina (PEI), (D) PEI + QS, onde: Sistema Opaco (SO), Microemulsão (ME), Separação de fases (SF). FA, FQ, FP e FPQ são os precursores de sistema líquido cristalino; FA30, FQ30, FP30 e FPQ30 são, respectivamente, as formulações

FA, FQ, FP e FPQ com 30% de saliva artificial. FA100, FQ100, FP100 e FPQ100 são, respectivamente, as formulações FA, FQ, FP e FPQ com 100% de saliva artificial.	59
Figura 12. Fotomicrografias das formulações FA, FA30, FA100, FQ, FQ30, FQ100, FP, FP30, FP100 e FPQ, FPQ30 e FPQ100. Aumento 40 x.....	63
Figura 13. Avaliação estrutural das formulações por SAXS: a) FA, FA30 e FA100; b) FQ, FQ30 e FQ100; c) FP, FP30 e FP100; d) FPQ, FPQ30 e FPQ100. As setas indicam os picos de Bragg.....	67
Figura 14. Reogramas das formulações. Símbolos cheios curva ascendente e símbolos vazios curva descendente.....	71
Figura 15. Valores médios de índice de fluxo de acordo com a formulação utilizada e respectivos IC95%.....	72
Figura 16. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolo cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência para todas as formulações.....	76
Figura 17. Força de mucoadesão (mN) das formulações.	84
Figura 18. Curva analítica do peptídeo CTT1 no intervalo de concentração entre 20 µg/mL a 200 µg/mL.	87
Figura 19. Curva analítica do AM em água com intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 µg/mL obtida por espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm.	89
Figura 20. Equipamento Microette (Hanson Corporation) constituído Célula de Difusão de Franz. Onde: 1- Béquer jaquetado onde se armazena o meio receptor em temperatura constante; 2- Banho de água com temperatura constante; 3- Equipamento Microette; 4- Aparato com 6 células de Franz; 5- Amostrador. (Foto tirada pela autora).	91
Figura 21. Esquema ilustrativo da célula de Franz (Adaptado de SERAFIM, 2013).	91
Figura 22. Esquema ilustrativo do funcionamento do equipamento Microette. (Adaptado de https://files.hansonresearch.com/wp-content/uploads/2015/03/How-the-Automated-System-Works_text.png).	92
Figura 23. Perfil de liberação do peptídeo CTT1 em solução (CTT1), do peptídeo CTT1 incorporado na formulação FPQ (FPQ-CTT1), do peptídeo CTT1 incorporado na formulação FA (FA-CTT1), do AM em solução (AM), do AM incorporado na formulação na FPQ (FPQ-AM) e do AM incorporado na formulação FA (FA-AM) em 24 horas.....	93
Figura 24. Espectro de absorvância da formulação FPQ, do azul de metileno em solução (AM) e do azul de metileno incorporado na formulação FPQ (FAM) antes e após 20 minutos de irradiação de luz.....	97

Figura 25. Espectro de CD do peptídeo em solução e após sua incorporação na formulação (FPQ- P).....	99
Figura 26. Zimograma em gel representativo do efeito do peptídeo CTT1 sobre a ação da enzima MMP- 9 após 1 hora de incubação. As concentrações utilizadas de peptídeo foram 10, 50, 100 e 200 µg/mL. O controle (ctrl) é 5 µg do meio condicionado.....	100
Figura 27. Zimograma em gel representativo do efeito do peptídeo CTT1 incorporado na formulação FPQ sobre a ação da enzima MMP- 9 após 1 hora de incubação. As concentrações incorporadas de peptídeo foram 10, 50, 100 e 200 µg/mL. O controle (ctrl) é 5 µg do meio condicionado. 1% e 2% é a diluição de FPQ no meio condicionado.	100
Figura 28. Zimograma em gel representativo do efeito do peptídeo CTT1 incorporado na formulação FPQ sobre a ação da enzima MMP- 9 e MMP-2 após 12 horas de incubação. As concentrações incorporadas de peptídeo foram 100 e 200 µg/mL. O controle (ctrl) é 5 µg do meio condicionado. 1% e 2% é a diluição apenas de FPQ no meio condicionado.	101
Figura 29. Efeito citotóxico de diferentes concentrações do peptídeo CTT1 em 24h, 48h e 72h sobre a linhagem celular SiHA.	102
Figura 30. Efeito citotóxico de diferentes concentrações do peptídeo CTT1 em 24h, 48h e 72h sobre a linhagem celular SCC25.	102
Figura 31. Determinação do potencial citotóxico de concentrações variadas (%) da formulação FPQ sobre as linhagens SiHA após 12 horas e 24 horas de tratamento.	103
Figura 32. Determinação do potencial citotóxico de concentrações variadas (%) da formulação FPQ sobre as linhagens SCC25 após 12 horas e 24 horas de tratamento.	103
Figura 33. Determinação do potencial citotóxico de concentrações variadas da (A) formulação (mg/mL), (B) azul de metileno (ug/mL) e (C) peptídeo CTT1 (ug/mL) sobre as linhagens HaCaT e HSC-3 após 1 hora de tratamento e 3 horas de tratamento.	105
Figura 34. Efeito citotóxico do azul de metileno na ausência de luz (A) e mediada pela terapia fotodinâmica com LED 660 nm com dose de luz de 12,5J/cm ² (B) e 25 J/cm ² (C) sobre as linhagens HaCaT e HSC-3. As concentrações utilizadas de azul de metileno foram 0, 1, 3, 6 e 12 µg/mL.	107
Figura 35. Imagens representativas (10x magnitude) do CAM para avaliação das alterações vasculares in ovo no 17º dia de desenvolvimento embrionário do controle (A) e após a aplicação de 40 uL de fase oleosa ácido oleico (B), dispersão bipolimérica contendo 0,25% de quitosana e 0,25% de polietilenoimina (C) e tensoativo Procetyl [®] AWS (D).	109

Figura 36. Imagens representativas (10x magnitude) do CAM para avaliação das alterações vasculares in ovo no 17º dia de desenvolvimento embrionário do controle (A) e após a aplicação de 10 µL por dia durante 4 dias de 10% de FPQ em PBS 1x (FPQ 10) (B).	110
Figura 37. Imagens representativas (10x magnitude) do efeito dos tratamentos no crescimento das células SiHA.....	112
Figura 38. Números de vasos contados <i>ex ovo</i> ao redor do tumor. * p< 0,05.....	113
Figura 39. Imagens do efeito dos tratamentos no crescimento das células SiHA após 4 dias de tratamento sem a terapia fotodinâmica.	114
Figura 40. Imagens do efeito dos tratamentos no crescimento das células SiHA após 4 dias de tratamento com a terapia fotodinâmica.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos para a avaliação do crescimento tumoral em CAM.....	52
Tabela 2. Nomenclatura e composição (%) das formulações acrescidas ou não com saliva. ..	61
Tabela 3. Valores de $q_{max}(\text{Å})$ e razão entre as distâncias interplanares para as formulações.	68
Tabela 4. Valores do índice de consistência (K) e do comportamento de fluxo (n) das formulações estudadas.....	72
Tabela 5. Principais estatísticas descritivas para a variável índice de consistência (K) segundo a formulação. Formulação: FA- água; FQ- quitosana; FP- polietilenoimina; FPQ- polietilenoimina/quitosana; 0, 30 e 100 – concentração de saliva.	73
Tabela 6. Sumário da Análise de Variância a dois fatores.	74
Tabela 7. Valores médios e desvios-padrão obtidos para todos os grupos formados a partir do cruzamento das variáveis formulação e saliva. Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha correspondem à medias com diferença não significativa ($p \geq 0,051$) de acordo com o teste de Games-Howell.....	74
Tabela 8. Principais estatísticas descritivas para o módulo de armazenamento G' segundo a formulação.....	77
Tabela 9. Sumário da Análise de Variância a dois fatores.	78
Tabela 10. Valores médios e desvios-padrão obtidos para todos os grupos formados a partir do cruzamento das variáveis formulação e saliva. Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha correspondem à medias com diferença não significativa ($p \geq 0,079$) de acordo com o teste de Games-Howell.....	78
Tabela 11. Principais estatísticas descritivas para o módulo de perda G'' segundo a formulação. Formulação: FA- água; FQ- quitosana; FP- polietilenoimina; FPQ- polietilenoimina/quitosana; 0, 30 e 100 – concentração de saliva.	79
Tabela 12. Sumário da Análise de Variância a dois fatores.	80
Tabela 13. Valores médios e desvios-padrão obtidos para todos os grupos formados a partir do cruzamento das variáveis formulação e saliva. Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha correspondem à medias com diferença não significativa ($p \geq 0,086$) de acordo com o teste de Games-Howell.....	80
Tabela 14. Propriedades mecânicas das formulações determinadas pela análise de perfil de textura. Cada valor representa a média \pm desvio padrão, à temperatura de 25° C.....	82

Tabela 15. Principais estatísticas descritivas para a variável mucoadesão segundo a formulação. Formulação: FA- água; FQ- quitosana; FP- polietilenoimina; FPQ- polietilenoimina/quitosana; 0, 30 e 100 – concentração de saliva.	84
Tabela 16. Sumário da Análise de Variância a dois fatores.	85
Tabela 17. Valores médios e desvios-padrão obtidos para todos os grupos formados a partir do cruzamento das variáveis formulação e saliva. Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha correspondem a medias com diferença não significativa ($p \geq 0,051$) de acordo com o teste de Games-Howell.	85
Tabela 18. Resultados da linearidade do CTT1.	87
Tabela 19. Precisão intra-corrída e precisão intermediária do método avaliado em concentrações diferentes de CTT1.	88
Tabela 20. Resultados da linearidade do AM.	89
Tabela 21. Precisão intra-corrída e precisão intermediária do método avaliado em concentrações diferentes de azul de metileno.	90
Tabela 22. Os parâmetros ajustados dos modelos cinéticos utilizados na liberação dos fármacos CTT1 e AM.	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
	2.1 Câncer Bucal.....	24
	2.2 Metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos do câncer bucal	25
	2.3 Terapia Fotodinâmica	27
	2.4 Sistemas líquidos cristalinos	30
3	OBJETIVO	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
	4.1 Materiais	34
	4.1.1 Matérias-primas, reagentes e soluções.....	34
	4.1.2 Equipamentos.....	34
	4.2 Métodos	35
	4.2.1 Preparação da dispersão de quitosana 5% (m/m).....	35
	4.2.2 Preparação da solução de polietilenoimina 5% (m/m).....	35
	4.2.3 Preparação da solução de polietilenoimina a 2,5% (m/m) e quitosana a 2,5% (m/m). 35	
	4.2.4 Construção dos diagramas de fases.....	35
	4.2.5 Microscopia de luz polarizada (MLP) e seleção dos sistemas precursores de cristal líquido (SPCL)	37
	4.2.5.1 Análise de Reprodutibilidade para Calibração do Pesquisador	37
	4.2.5.2 Microscopia de luz polarizada	37
	4.2.6 Efeito dos componentes da saliva artificial na estrutura do SPCL selecionados 37	
	4.2.7 Microscopia de luz polarizada	38
	4.2.8 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	38
	4.2.9 Análises reológicas	38
	4.2.9.1.1 Análise reológica contínua.....	38
	4.2.9.1.2 Análise reológica oscilatória	39
	4.2.10 Análise de perfil de textura	40
	4.2.11 Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	40
	4.2.12 Validação da metodologia analítica para quantificação do CTT1 por espectrofotometria no UV-vis.	42
	4.2.12.1 Linearidade.....	42
	4.2.12.2 Seletividade	42
	4.2.12.3 Precisão	42
	4.2.12.4 Exatidão – recuperação	43
	4.2.12.5 Limite de detecção e limite de quantificação	43

4.2.13	Validação da metodologia analítica para quantificação do azul de metileno por espectrofotometria V-vis.....	43
4.2.13.1	Linearidade.....	43
4.2.13.2	Seletividade.....	44
4.2.13.3	Precisão.....	44
4.2.13.4	Exatidão – recuperação.....	44
4.2.13.5	Limite de detecção e limite de quantificação.....	44
4.2.14	Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> do peptídeo CTT1 e do azul de metileno (AM).....	45
4.2.15	Estudo da fotodegradação (<i>photobleaching</i>).....	45
4.2.16	Ensaio de dicroísmo circular.....	45
4.2.17	Zimografia em gel.....	46
4.2.18	Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo ensaio de Sulforrodamina B (SRB).....	46
4.2.18.1	Linhagem celular.....	46
4.2.18.2	Cultivo celular.....	46
4.2.18.3	Avaliação de citotoxicidade pelo ensaio de Sulforrodamina B.....	47
4.2.19	Avaliação de foto e citotoxicidade pelo método de redução do MTT.....	48
4.2.19.1	Linhagens celulares.....	48
4.2.19.2	Cultivo Celular.....	48
4.2.19.3	Avaliação de citotoxicidade pelo método de redução do MTT.....	48
4.2.19.4	Avaliação de fotocitotoxicidade pelo método de redução do MTT.....	50
4.2.19.4.1	Fonte de luz.....	50
4.2.19.4.2	Tratamento com a formulação selecionada FPQ.....	50
4.2.20	Ensaio <i>in vivo</i> utilizando o modelo de membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM).....	50
4.2.20.1	Obtenção dos ovos embrionados.....	50
4.2.20.2	Ensaio para avaliação das alterações vasculares da CAM.....	51
4.2.20.3	Ensaio para avaliação do crescimento tumoral.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	Construção dos diagramas de fases.....	53
5.2	Efeito dos componentes da saliva artificial na estrutura do SPCL selecionados.....	61
5.2.1	Microscopia de luz polarizada.....	62
5.2.2	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	65
5.2.3	Análises reológicas.....	69
5.2.3.1	Análise reológica contínua.....	69
5.2.3.2	Análise reológica oscilatória.....	75
5.2.4	Análise do Perfil de Textura.....	81

5.2.5	Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	83
5.2.6	Validação da metodologia analítica para quantificação do CTT1 por espectrofotometria UV-Vis.	86
5.2.7	Validação da metodologia analítica para quantificação do azul de metileno por espectrofotometria UV-Vis	88
5.2.8	Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> do peptídeo CTT1 e do azul de metileno (AM).....	90
5.2.9	Estudo da Fotodegradação do AM (<i>Photobleaching</i>).....	96
5.2.10	Dicroísmo celular	98
5.2.11	Zimografia em gel	99
5.2.12	Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo ensaio de Sulforrodamina B (SRB) 101	
5.2.13	Avaliação de foto e citotoxicidade pelo método de redução do MTT	104
5.2.14	Ensaio <i>in vivo</i> utilizando o modelo de membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM).....	108
5.2.14.1	Ensaio para avaliação das alterações vasculares da CAM.....	108
5.2.14.2	Ensaio para avaliação do crescimento tumoral	111
6	CONCLUSÃO	116
	REFERENCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

O câncer bucal é definido como um tumor maligno que afeta lábio, mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua e assoalho da boca (LONGO *et al.*, 2011), sendo o carcinoma de células escamosas (CCE) da língua, o tipo mais comum de câncer bucal. A estimativa da incidência mundial é de aproximadamente 300 mil novos casos por ano. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimou cerca de 15 mil novos casos para o ano de 2012 (CSIKAR *et al.*, 2012; TORRES-PEREIRA *et al.*, 2012). Trata-se do sexto tipo de câncer mais comum no mundo, sendo decorrente de uma somatória de fatores, principalmente de origem extrínseca, tais como tabagismo e etilismo (LIM *et al.*, 2012, KAMINAGAKURA, 2012).

A progressão do câncer bucal está relacionada com a produção descontrolada de metaloproteinases da matriz (MMPs) pelas células tumorais. As MMPs são um importante grupo de enzimas proteolíticas zinco-dependentes responsáveis pela modulação da proliferação, apoptose e angiogênese (NAVARRO *et al.*, 2006). Estudos indicaram que de todas as MMPs, as gelatinases MMP-2 e MMP-9, em particular, estão muito associadas aos tipos mais agressivos de carcinomas da cabeça, pescoço e língua. Essas enzimas hidrolisam o colágeno do tipo IV, que é um importante componente das membranas basais, favorecendo o processo de metástase e diminuindo drasticamente a sobrevida dos pacientes (SUOJANEN, 2009).

Apesar da alta prevalência e das severas consequências que essa doença pode provocar, como a invalidez, deformidades faciais e, por fim, a morte, poucas campanhas de informação e prevenção são desenvolvidas no Brasil como ação nacional. Por isso, na maioria dos casos, a doença é detectada em fase avançada, na qual o tratamento se torna o único recurso para se combater a doença (RODRÍGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2012; TORRES-PEREIRA *et al.*, 2012).

O tratamento convencional é de alto custo econômico e, em muitos casos, com prognóstico desfavorável. Além disso, as terapias convencionais se deparam com problemas relacionados com as características físico-químicas e farmacocinéticas dos fármacos, o que resulta em biodistribuição não seletiva. Como consequência, concentrações ineficientes do fármaco são obtidas na massa tumoral, juntamente com intensa atividade citotóxica sobre as células saudáveis (HOLGADO *et al.*, 2012).

Dessa forma, muitos pesquisadores estão se empenhando, cada vez mais, na descoberta de novas moléculas bioativas para uso na terapia antitumoral. Em razão do

progresso da engenharia genética, os peptídeos têm recebido grande atenção, se tornando fármacos de escolha para muitas doenças, sobretudo, o câncer (RAVAL *et al.*, 2012).

Os peptídeos apresentam papel chave como mediadores das principais funções biológicas e possuem propriedades intrínsecas, como alta atividade biológica associada à baixa toxicidade, baixa imunogenicidade e alta especificidade. Essas características proporcionam vantagens como a baixa probabilidade de ligação às estruturas moleculares que não sejam o alvo desejado, interações medicamentosas minimizadas e baixo acúmulo nos tecidos, o que reduz, portanto, os riscos de complicações pela formação de metabólitos intermediários e de efeitos colaterais, o que os torna extremamente interessante na terapia antitumoral (DASS *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por Heikkila e colaboradores (1999) avaliou uma série de peptídeos sintéticos antitumorais. Dentre os peptídeos estudados, observou-se que o peptídeo antigelatinolítico CTT1, designado pela sequência de aminoácidos Cys - Thr - Thr - His - Trp - Gly - Phe - Thr - Leu - Cys, demonstrou ação *in vitro* contra o CCE da língua, pelo mecanismo de inibição específica das enzimas proteolíticas metaloproteinases de matriz (MPPs) do tipo 2 (MPP-2) e 9 (MPP-9), suprimindo a migração de células endoteliais e cancerígenas *in vitro* e inibindo a progressão do tumor *in vivo* em ratos.

Apesar de muitas moléculas peptídicas candidatas a agentes terapêuticos apresentarem sucesso em experimentos *in vitro* e em modelos animais, muitas vezes este quadro pode não se manter nos ensaios em humanos (SARCIAUX, 1995; ZHOU, 1994). Os peptídeos apresentam características físico-químicas que podem afetar sua ação biológica, como fraca permeabilidade intestinal face à sua elevada massa molecular e baixa biodisponibilidade oral (SILVA *et al.*, 2002), devido ao metabolismo hepático de primeira passagem. Desse modo, para a sua administração recorre-se à utilização da via parenteral, a qual pode apresentar uma série de inconvenientes, como a necessidade de repetidas injeções devido a sua reduzida meia-vida (BURKE, 2000), além da possibilidade de aparecimento de efeitos indesejados, como a tromboflebite e a necrose tecidual (ZHOU *et al.*, 1991). Ademais, o peptídeo CTT1 é hidrofóbico devido à sua sequência de aminoácidos, e sua baixa solubilidade em água dificulta a administração em meio fisiológico, podendo diminuir sua eficácia terapêutica (MEDINA *et al.*, 2001).

Assim, o emprego de sistemas de liberação controlada e de vias alternativas de administração podem ser estratégias atraentes para a administração de peptídeos (BHARDWAJ *et al.*, 2012). No caso do peptídeo CTT1, a sua incorporação em um sistema de liberação clinicamente adequado, seguro e efetivo visando à sua administração bucal

demonstra ser uma opção interessante para viabilizar o seu uso no tratamento do câncer bucal. A mucosa bucal é permeável e robusta, ou seja, permite recuperação rápida após o estresse ou dano, além de apresentar um ótimo fornecimento de sangue e ausência do efeito de primeira passagem, o que evita o metabolismo pré-sistêmico do fármaco pelo trato gastrointestinal. Isso a torna uma via de administração muito atraente para a liberação de peptídeos (SENEL, 2001). Apesar de apresentar essa série de vantagens, a administração bucal apresenta algumas limitações, devido, principalmente, à secreção contínua da saliva (0,5 a 2 L/ dia), o que pode levar à diluição e possível ingestão do fármaco e, em última instância, à remoção involuntária da forma farmacêutica (HEARNDEN *et al.*, 2012).

Sistemas nanoestruturados de liberação, englobando sistemas líquidos cristalinos, microemulsões, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados representam plataformas promissoras para administração bucal de peptídeos, pois esses sistemas conseguem protegê-los da degradação e aumentar o tempo de permanência da formulação no ambiente bucal, possibilitando uma liberação controlada no local específico de ação (KANG, 2009).

Dentre esses sistemas, os sistemas líquidos cristalinos liotrópicos (SLCL) se destacam, pois são formados por tensoativos que formam mesofases líquidos cristalinos lamelares, hexagonais e cúbicas, respectivamente, pela adição gradativa de solventes, como a água.

A mesofase lamelar é uma estrutura unidimensional formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente. A mesofase hexagonal é formada por camadas de tensoativo e solvente que se arranjam em forma de cilindros formando uma estrutura bidimensional. Finalmente, a mesofase cúbica é formada por duas redes de canais de solvente envolvidas por bicamadas de tensoativo arranjadas numa estrutura organizada tridimensional (FORMARIZ *et al.*, 2005; URBAN, 2004).

Portanto, o aumento gradativo de água no SLCL aumenta a organização da estrutura do sistema, o que resulta no aumento da viscosidade da formulação. Dessa forma, sistemas precursores de cristais líquidos (SPCL) são interessantes para administração bucal de fármacos, pois podem se apresentar líquidos, facilitando a administração da formulação, por exemplo, por seringa. Contudo, ao entrar em contato com o ambiente bucal, o SPCL tem a capacidade de incorporar água da saliva, se tornando uma mesofase líquido-cristalina mais viscosa, o que pode promover liberação controlada e resultar em maior substantividade do peptídeo no tumor bucal (BRUSCHI *et al.*, 2008, CHORILLI *et al.*, 2009).

Dentre os vários tensoativos que conseguem formar cristais líquidos com a adição de água, o tensoativo álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP, cujo nome comercial é

Procetyl AWS[®], se destaca, pois, é um tensoativo não iônico que consegue formar cristais líquidos sem adição de cotensoativo devido a sua capacidade de auto-organização pela ausência de interações eletrostáticas repulsivas.

A otimização do tempo de contato da formulação com a célula tumoral, com o objetivo de prolongar a liberação e diminuir a administração repetida do peptídeo, pode ser alcançada utilizando dispersões poliméricas mucoadesivas como fase aquosa dos SPLC, pois alguns polímeros apresentam excelente adesividade pela mucosa bucal (SMART *et al.*, 2003). Adicionalmente, estudos demonstraram que determinados polímeros também apresentam a capacidade de proteger os peptídeos contra a degradação enzimática *in vivo* (PERCHYONOK *et al.*, 2012; MUHEEM *et al.*, 2016). Desse modo, o desenvolvimento farmacotécnico de SPCL com incorporação de agentes poliméricos mucoadesivos é atraente para a liberação controlada de peptídeos na terapia do câncer bucal, uma vez que proporcionam vetorização do fármaco, juntamente com um ambiente protetor a ele.

A quitosana (QS), $\alpha(1-4)$ -2-amino-2-deoxi β -D-glucana, uma forma desacetilada da quitina, é um polissacarídeo catiônico biocompatível, biodegradável e com baixa citotoxicidade e tem sido empregada com sucesso em sistemas de liberação para incorporação de antitumorais (JIANG *et al.*, 2007; JERE *et al.*, 2009). Este polímero também tem sido muito usado para otimizar a administração de fármacos por via bucal, pois apresenta uma excelente capacidade mucoadesiva. Essa alta mucoadesão é devido às forças de atração molecular por interações eletrostáticas com a saliva, que é carregada negativamente. Além disso, a QS pode atuar como promotor de absorção (SENEL *et al.*, 2000; VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001).

As polietilenoiminas (PEI) são polímeros solúveis em água e com alta densidade de carga catiônica em pH fisiológico, devido aos grupamentos amino protonáveis em cada terceira posição (GÜNTHER *et al.*, 2011). As PEI também têm sido muito investigadas para a terapia contra o câncer com o objetivo de promover *uptake celular* de fármacos, pois esses polímeros têm a capacidade de interagir, por forças de atração, com as proteínas extracelulares de membrana, que apresentam carga negativa, em razão da expressão elevada de fosfatidilserina, um fosfolípido aniônico (JERE *et al.*, 2009).

A PEI também tem sido muito utilizada para a transfecção celular de ácido desoxirribonucleico (ADN) ou de ácido ribonucleico (ARN) visando à terapia gênica. Isso também ocorre em virtude dessa elevada densidade de grupos aminos parcialmente protonados em pH fisiológico, que permite condensar o ADN (poliplexos) e facilitar sua saída do endossoma. Assim, após a internalização nas células, os prótons liberados pelo processo de

acidificação dos endossomas são captadas pelos grupos aminas da PEI, impedindo a queda do pH endossomal. Dessa forma, continua a ocorrer a entrada de prótons e a saída de íons cloreto, os quais induzem o influxo de água, causando turgidez osmótica e subsequente ruptura da membrana endossomal, permitindo que os políplexos sejam liberados para o citosol (BENJAMINSEN *et al.*, 2013; RADAIC *et al.*, 2016).

Estudos da literatura têm relatado a associação de PEI com QS para administração de antitumorais objetivando aumentar a afinidade pela célula alvo. Jere e colaboradores (2007) desenvolveram um sistema copolimérico composto por PEI e QS para a incorporação do antitumoral siAkt. Os autores observaram otimização do tratamento contra células tumorais de pulmão para este antitumoral incorporado neste sistema com os polímeros associados.

Embora as terapias peptídicas antitumorais tenham se mostrado promissoras, a mortalidade do câncer bucal ainda é bastante alta. Sabe-se que a combinação de terapias para os pacientes com câncer tem papel fundamental na redução de ressurgimento do câncer e no aumento de sua sobrevida (THOMAS & HORTOBAGYI, 2003). Logo, terapias adjuvantes precisam ser continuamente exploradas.

Dessa forma, a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido utilizada promissoriamente com o objetivo de potencializar o tratamento contra o câncer bucal (GARG *et al.*, 2012; VELLOSO *et al.*, 2012; LONGO *et al.*, 2013). A TFD visa à destruição localizada do tecido vivo anormal mediante sua necrose, inviabilização, desativação de vírus ou destruição de bactérias e fungos (MACHADO, 2000). Essa terapia apresenta inúmeras vantagens, como possibilidade de repetição sem indução de resistência ao fármaco, uso concomitante com outras terapias e destruição tecidual seletiva sem provocar danos extensos às estruturas normais circundantes (AMARAL, 2010). Além disso, a TFD tem despertado grande interesse pelo seu baixo custo operacional, quando comparado aos tratamentos convencionais, como a cirurgia e quimioterapia, pois pode ser realizada em ambiente ambulatorial, dispensando em alguns casos as internações hospitalares (LONGO *et al.*, 2009).

A TFD fundamenta-se na utilização de um fármaco fotossensibilizante (FS) e luz, num comprimento de específico para ativar apenas o FS, o que provoca um dano seletivo ao tecido tumoral, sendo essa seletividade a essência do sucesso do tratamento do câncer (SCHMITT *et al.*, 2012). Na presença de oxigênio encontrado nas células, o FS ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres (reação do tipo I), gerando íons peróxidos, ânion-radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e radicais hidroxilas e, conseqüentemente, uma cascata de espécies reativas de oxigênio (EROs), que promove o efeito citotóxico por apoptose ou necrose das células tumorais. O FS

também pode reagir por transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de oxigênio singlete, um agente altamente citotóxico. Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente (PERUSSI, 2007).

Corantes fenotiazínicos hidrofílicos têm sido empregados como FS, como é o caso do azul de metileno (AM), aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Eles exibem intensa absorção de luz com comprimento de onda entre 600 e 660 nm, que é uma região do espectro útil em TFD por estar na janela terapêutica requerida para a eficiente penetração da luz nos tecidos (TARDIVO *et al.*, 2005) e têm sido usados no tratamento de câncer de bexiga, contra tumores de esôfago inoperáveis, virulências da pele, psoríase, adenocarcinomas e câncer bucal (PERUSSI, 2007).

Uma forma de direcionar a ação do AM aos tecidos doentes consiste na sua veiculação em um SPCL (ROSSETTI *et al.*, 2011). O AM, por ser catiônico, pode promover uma atração eletrostática na superfície da célula tumoral, que é negativa (JORI *et al.*, 2006), podendo aumentar ainda mais a afinidade do SPCL pela célula alvo.

Portanto, tendo como base o panorama atual desfavorável às modalidades terapêuticas convencionais para o tratamento do câncer bucal representadas, principalmente, pela cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sugere-se que a terapia peptídica aliada à TFD, pela incorporação do peptídeo CTT1 e do azul de metileno em SPLC mucoadesivos, possa oferecer uma promissora e inexplorada ferramenta nanobiotecnológica para o tratamento do câncer bucal.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para os sistemas desenvolvidos mostraram ser promissores como SPCL para a via bucal, uma vez que a MLP e o SAXS evidenciaram o aumento de viscosidade e a formação de sistemas líquido-cristalinos com a incorporação crescente de água presente na saliva nos sistemas selecionados.

O ensaio de zimografia em gel demonstrou que o peptídeo em solução a 100 µg/mL foi capaz de inibir a ação das metaloproteinases de matriz; no entanto, quando o peptídeo foi incorporado da formulação, esse efeito não foi observado.

O teste de dicroísmo circular demonstrou que a formulação não alterou a estrutura conformacional do peptídeo.

O ensaio de *photobleaching* (fotodegradação) mostrou que a FPQ protegeu o AM da degradação.

A formulação FPQ composta por 40% de Procetyl[®] AWS (tensoativo), 40% de ácido oleico (fase oleosa) e 20% da dispersão bipolimérica composta por 0,25% de polietilenoimina e 0,25% de quitosana (p/p) (fase aquosa) apresentou potencial citotóxico quando analisada *in vitro* em culturas de células de carcinoma epidermóide de língua (SCC-25) e de células de carcinoma escamoso oral humano (HSC-3) por meio do ensaio sulforrodamida e MTT, respectivamente.

O peptídeo CTT1 não apresentou citotoxicidade enquanto que o AM apresentou fotocitotoxicidade dose dependente quando incorporado em FPQ.

A formulação FPQ-10 (10% da formulação FPQ) não demonstrou afetar os vasos sanguíneos da membrana corioalantóica do embrião da galinha (CAM)

Os testes para avaliar o crescimento tumoral mostraram que o peptídeo teve uma ação melhor que a formulação; no entanto, quando o peptídeo foi adicionado na formulação essa ação foi menor, o que era esperado uma vez que formulação retarda a liberação do peptídeo em 8h.

O AM incorporado ou não em FPQ demonstraram a mesma ação após a terapia fotodinâmica, mostrando que o FPQ libera de forma gradual o AM, agindo como um sistema de liberação controlada de fármacos.

Os resultados sugerem que o sistema FPQ apresenta potencial para incorporação do peptídeo CTT1 e AM objetivando o tratamento do câncer bucal.

REFERENCIAS

AGHAHOSSEINI, F. *et al.* Methylene blue-mediated photodynamic therapy: A possible alternative treatment for oral lichen planus. **Lasers in surgery and medicine**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2006.

AGUEROS, M. *et al.* Combined hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 405-413, 2009.

ALLEN, T. *et al.* Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.

ALLISON, R. R. *et al.* Bio-nanotechnology and photodynamic therapy—state of the art review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 5, n. 1, p. 19-28, 2008.

ALLISON, R. R.; Moghissi, K. Photodynamic therapy (pdt): Pdt mechanisms. **Clinical endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24-29, 2013.

ALMEIDA, M. R. Estudo citogenético em camundongos C57BL/6 selvagens e knockout para o gene da galectina-3 tratados com o carcinógeno 4NQO. 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2008.

ALVES E SILVA, A. R. Estudos Fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas. 123 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 2010.

AMARAL, R. R. Photodynamic therapy in endodontics - review of literature. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, v. 15, n. 2, p. 207-211, 2010.

AMASYA, G. *et al.* Bioadhesive and mechanical properties of triamcinolone acetone buccal gels. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 1-12, 2012.

BARBER, D. A. et al. The use of methylene blue as an extravascular surgical marker impairs vascular responses of human saphenous veins. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 109, n. 1, p. 21-29, 1995.

BENERGOSSI, J. et al. Highlights in peptide nanoparticle carriers intended to oral diseases. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 4, p. 345-355, 2015.

BERNEGOSSI, J. **Desenvolvimento, caracterização, e ação antifilme oral de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo o peptídeo KSL-w**. 2014. 104 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

BERNEGOSSI, J. et al. Green tea glycolic extract-loaded liquid crystal systems: development, characterization and microbiological control. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 383-390, 2016.

BERNEGOSSI, J. et al. Peptide KSL-W-Loaded Mucoadhesive Liquid Crystalline Vehicle as an Alternative Treatment for Multispecies Oral Biofilm. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 37, 2015.

BHARDWAJ, V.; RAVI KUMAR, M. N. V. **Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery**. 1. ed. Estados Unidos da América: Springer US, 2012. p. 493-516.

BIRKEDAL-HANSEN, B. et al. Oral and Maxillofacial Pathology: MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues. **Oral diseases**, v. 6, n. 6, p. 376-382, 2000.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2016). Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>. Acessado em 31/03/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, Brasília, 2003. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>. Acessado em 31/03/2016.

BREMER, C. et al. *In vivo* molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition. **Nature medicine**, v. 7, n. 6, p. 743-748, 2001.

BRUSCHI, M. L. et al. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: development and characterization. **Drug Delivery Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 3, p. 267-278, 2008.

BRUSCHI, M. L. et al. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: in vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 2074-2089, 2007.

BURKE, P.A. Controlled release protein therapeutics: Effects of process and formulation on stability. In: WISE, D. L., ed. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. New York: Marcel-Dekker, 2000. p. 661-692.

BURKE, P.A. Controlled release protein therapeutics: Effects of process and formulation on stability. In: WISE, D. L., ed. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*. New York: Marcel-Dekker, 2000. p. 661-692.

BUZZÁ, H. H. et al. Evaluation of vascular effect of Photodynamic Therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 1-7, 2014.

CALIXTO, G. et al. Design and Characterization of a Novel p1025 Peptide-Loaded Liquid Crystalline System for the Treatment of Dental Caries. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 158, 2016.

CALIXTO, G. M. F. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados bioadesivos contendo peptídeo análogo à adesina do *Streptococcus mutans***. 2013. 105 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125-132, 1997.

CARDOSO, V. **Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de fármacos.** 2014. 198f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2014.

CARVALHO, F.C. et al. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant-containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, 2012.

CHATTOPADHYAY, D. P. et al. Aqueous behaviour of chitosan. **International Journal of Polymer Science**, v. 2010, 7 p., 2010.

CHAUDHARY, K. et al. **Novel Approaches for Drug Delivery.** Estados Unidos da América: IGI Global, 2016. cap. 9. 515 p.

CHEN, Y. et al. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. **BioMed research international**, v. 2014, 12 p., 2014.

CHEN, Y. et al. Use of methylene blue as a diagnostic aid in early detection of oral cancer and precancerous lesions. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 7, p. 590-591, 2007.

CHO, B. et al. Mesophase structure-mechanical and ionic transport correlations in extended amphiphilic dendrons. **Science**, v. 305, n. 5690, p. 1598-1601, 2004.

CHORILLI, M. Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo. 2007. 172f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.

CHORILLI, M. et al. Development of liquid-crystalline systems using silicon glycol copolymer and polyether functional siloxane. **Química Nova**, v. 32, n. 4, 2009.

CHORILLI, M. et al. Rheological characterization and safety evaluation of non-ionic lamellar liquid crystalline systems containing retinylpalmitate. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 2, p. 394-403.

CHORILLI, M. et al. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids Surfaces B-Biointerfaces**, v.85, n. 2, p.182-188, 2011.

CINTRA, G. et al. Bioadhesive Surfactant Systems for Methotrexate Skin Delivery. **Molecules**, v. 21, p. 231, 2016.

CLIFTON, J. et al. Methylene blue. **American journal of therapeutics**, v. 10, n. 4, p. 289-291, 2003.

COSTA, P. et al. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123-133, 2001.

CRAGAN, J. Teratogen update: Methylene blue. **Teratology**, v. 60, n. 1, p. 42-48, 1999.

CRUSCA, E. J. R. et al. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a. **Peptide Science**, v. 96, p. 41-48, 2011.

CSIKAR, J. et al. Incidence of oral cancer among South Asians and those of other ethnic groups by sex in West Yorkshire and England, 2001-2006. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 51, n. 1, p. 25-29, 2012.

CURRAN, S. et al. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **The Journal of pathology**, v. 189, n. 3, p. 300-308, 1999.

DA HORA MACHADO, A. E. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

DAHL, J. E. Irritation of dental adhesive agents evaluated by the HET–CAM test. **Toxicology in vitro**, v. 13, n. 2, p. 259-264, 1999.

DAHL, J. et al. In vitro biocompatibility of denture relining materials. **Gerodontology**, v. 23, n. 1, p. 17-22, 2006.

DAMASCENO, B.P.G.L. et al. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p. 9-18, 2011.

DASS, C. R. et al. Biophysical delivery of peptides: Applicability for cancer therapy. **Journal of Biological and Food Science Research**, v. 27, n. 12, p. 3479-3488, 2006.

DOS SANTOS RAMOS, M. A. et al. Syngonanthus nitens Bong.(Rhul.)-Loaded Nanostructured System for Vulvovaginal Candidiasis Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1368, 2016.

DUARTE, R.A. Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR7531) tratadas com alcalóides isolados de *Pterogyne nitens*. 2010. 153f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) -, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, Araraquara, 2010.

EGEBLAD, M. et al. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-174, 2002.

EMSLEY, J. W.; LINDON, J. C. **NMR Spectroscopy Using Liquid Crystal Solvents**. revisada. ed. Elsevier, 2013. 386 p.

FASMAN, G. D. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. 1. ed. Nova Iorque: Plenum Press, 1996.

FEIGENSON, G. W. et al. Ternary Phase Diagram of Dipalmitoyl-PC/Dilauroyl-PC/Cholesterol: Nanoscopic Domain Formation Driven by Cholesterol. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 6, 2001.

FELIPPU, A. et al. Impact of delay in the diagnosis and treatment of head and neck cancer. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 82, n. 2, p. 140-143, 2016.

FERMANIAN, J. Measure de l'accord entre deux juges: cas quantitatif. **Revue d'Epidemiologie et de Santé Publique**, v. 32, p. 408-413, 1984.

FERREIRA, J. et al. Experimental determination of threshold dose in photodynamic therapy in normal rat liver. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 6, p. 469-475, 2007.

FERREIRA, S. et al. Rheological, mucoadhesive and textural properties of thermoresponsive polymer blends for biomedical applications. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 55, p. 164-178, 2015.

FERREIRA, S. et al. Desenho como possível veículo de descrição das percepções e conhecimentos sobre câncer bucal de um grupo de indivíduos sem formação educacional formal em Maceió, Alagoas-Brasil. **Saúde & Transformação Social/Health & Social Change**, v. 7, n. 2, p. 123-133, 2016.

FISHER, R. A. **Statistical methods for research workers**. 14. ed. Edimburgo: Oliver and Boyd, 1970. p. 213-249.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical Principles of Pharmacy**. 5. ed. Londres: London and Chicago : Pharmaceutical Press, 2011. 527 p.

FONSECA-SANTOS, B. **Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina no tratamento do câncer bucal**. 2015. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2015.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

FORMARIZ, T. P. *et al.* Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.63, p. 287-95, 2008.

FRANK, F. C. I. Liquid crystals. On the theory of liquid crystals. **Discussions of the Faraday Society**, v. 25, p. 19-28, 1958.

GABBOUN, N. H. *et al.* Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p.73-80, 2001.

GARG, A. D. *In vitro* studies on erythrosine-based photodynamic therapy of malignant and pre-malignant oral epithelial cells. **PLoS One**. v. 7, n. 4, 2012.

GAWAS, S. *et al.* Current approaches in buccal drug delivery system. **Pharmaceutical and Biological Evaluations**, v. 3, n. 2, p. 165-177, 2016.

GHOSH, I.; MICHNIAK-KOHN, B. Design and characterization of submicron formulation for a poorly soluble drug: The effect of Vitamin E TPGS and other solubilizers on skin permeability enhancement. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 434, p. 90-98, 2012.

GOKCE, E. *et al.* Nanoparticulate strategies for effective delivery of poorly soluble therapeutics. **Therapeutic delivery**, v. 1, n. 1, p. 149-167, 2010.

GONÇALEZ, M. L. *et al.* Skin delivery of kojic acid-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

GREENFIELD, N. Circular dichroism (CD) analyses of protein-protein interactions. **Protein-Protein Interactions: Methods and Applications**, p. 239-265, 2015.

GÜNTHER, M. *et al.* Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 438-449, 2011.

HAM-PICHAVANT, F. Fat resistance properties of chitosan-based paper packaging for food applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 3, p. 259-265, 2005.

HE, X. et al. Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous in vivo imaging and photodynamic therapy. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5601-5609, 2009.

HEARNDEN, V. et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 64, p. 16-28, 2012.

HEIKKILA, P. et al. Human tongue carcinoma growth is inhibited by selective antigelatinolytic peptides. **International Journal of Cancer**, v. 118, p. 2202-2209, 2006

HOLGADO, M. A. et al. Drug Targeting to Cancer by Nanoparticles Surface Functionalized with Special Biomolecules. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3188-3195, 2012.

HOLMQVIST, P. et al. Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer-Water-Oil Systems by Varying the Oil Type. **Macromolecules**. v. 30, p. 6788-6797, 1997.

HYDE, S. T. Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 16. p. 299-332.

ICH. International Conference on Harmonization. Topic Q2(R1). Validation of analytical procedures: text and methodology. 2005.

ILLUM, L. The nasal route for delivery of polypeptides. In: FROKJAER, S.; CHRISTRU, L.; KROGSGAARD-LARSEN, P. eds. **Peptide and protein Drug Delivery**. Copenhagen: Munksgaard, 1998. p. 157-170.

IMPOLA, U. et al. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. **The Journal of pathology**, v. 202, n. 1, p. 14-22, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativas de incidência do câncer no Brasil 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surfaces Forces**. 2nd. ed. New York: Academic, 1991.

ISRAELACHVILI, J. N.; MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, v. 72, n. 0, p. 1525-1568, 1976.

JERE, D. et al. Chitosan-graft-polyethylenimine for Akt1 siRNA delivery to lung cancer cells. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 378, p. 194-200, 2009.

JIANG, H. et al. Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 117, p. 187-195, 2007.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 450-457, 1997a.

JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, n. 2, p. 223-233, 1997b.

JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, 2006.

JUNQUEIRA, H. C. et al. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 4, n. 11, p. 2320-2328, 2002.

KAMINAGAKURA, E. et al, High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **International Journal of Cancer**, v.130, p.1726–1732, 2012.

KANG, M. L. et al. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnology Advances**, v.27, p.857–86, 2009.

KELLY, S. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KESSENBROCK, K. et al. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. **Matrix biology**, v. 44, p. 184-190, 2015.

KETSAWATSOMKRON, Pimonrat et al. Protective role for tissue inhibitor of metalloproteinase-4, a novel peroxisome proliferator-activated receptor- γ target gene, in smooth muscle in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Hypertension**, v. 67, n. 1, p. 214-222, 2016.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose**. 2007. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.

KLINKESORN, Utai; NAMATSILA, Yaowapa. Influence of chitosan and NaCl on physicochemical properties of low-acid tuna oil-in-water emulsions stabilized by non-ionic surfactant. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 5, p. 1374-1380, 2009.

KOIVUNEN, Erkki *et al.* Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 768-774, 1999.

KONAN, Yvette Niamien; GURNY, Robert; ALLÉMANN, Eric. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **biometrics**, p. 159-174, 1977.

LAWRENCE, M.J.; REES, D.G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, p.89-121, 2000.

LEITE, A. et al. Fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do câncer bucal: revisão. **Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica**, v.1, n.3, p. 31-36, 2005

LIM, M.E. et al. Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1912-1920, 2012.

Lin, S. C. et al. Functional genotype in matrix metalloproteinases-2 promoter is a risk factor for oral carcinogenesis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 33, n. 7, p. 405-409, 2004.

LIN, Y. et al. The expression and prognostic significance of hepatoma-derived growth factor in oral cancer . **Oral Oncology**, v. 48, n. 7, p. 629-635, 2012.

LONGO, J. P. F. et al. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.94, n.2, p. 143–146, 2009.

LONGO, J. P. F., AZEVEDO, R. B. Effect of photodynamic therapy mediated by methylene blue in cariogenic bacteria. **Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica**, v. 6, n. 3, p. 249-257, 2010.

LONGO, J. P. F. et al. Câncer bucal e a terapia fotodinâmica como modalidade terapêutica. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 59, p.51-57, 2011

LONGO, J. P. F. Photodynamic Therapy Mediated by Liposomal Chloroaluminum-Phthalocyanine Induces Necrosis in Oral Cancer Cells. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v.3, n.1, 2013.

LOPES, L. B. et al. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: in vitro and in vivo skin penetration of cyclosporin A. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 6, p. 1332-1342, 2006.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, 2000.

MACKAY, A. M. et al. Multifocal electroretinography as a predictor of maintenance of vision after photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration. **Documenta Ophthalmologica**, v. 116, n. 1, p. 13-18, 2008.

MALMSTEN, M. Surfactants and Polymers in Drug Delivery. New York: Infoma Healthcare, 2002. 348 p.

MANAIA, E. B. **Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO₂ para proteção solar e liberação controlada de terpinem-4-ol**. 2012. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

MARQUES, M. et al. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. **Dissolution Technologies**, v. 18, n. 3, p. 15-28, 2011.

MARTINDALE et al. **The Complete Drug Reference**. 38th. ed. Estados Unidos da América: Pharmaceutical Press, 2014. cap. 9. 4596 p.

MARTINHO, O. et al. In vitro and in vivo studies of temozolomide loading in zeolite structures as drug delivery systems for glioblastoma. **RSC Advances**, v. 5, n. 36, p. 28219-28227, 2015.

MEDINA, O. P. Binding of novel peptide inhibitors of type IV collagenases to phospholipid membranes and use in liposome targeting to tumor cells in vitro. **Cancer Research**, v. 61, p. 3978–3985, 2001.

MERINO-BOHÓRQUEZ, V. et al. Physicochemical stability of a new topical timolol 0.5% gel formulation for the treatment of infant hemangioma. **Pharmaceutical development and technology**, v. 20, n. 5, p. 562-569, 2015.

MEZZENGA, R. et al. **Self-Assembled Supramolecular Architectures: Lyotropic Liquid Crystals**. Estados Unidos da América: John Wiley & Sons, 2012. p. 1-20.

MUHEEM, Abdul et al. A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 4, p. 413-428, 2016

NAFEE, N. A. et al. Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing. **International journal of pharmaceutics**, v. 264, n. 1, p. 1-14, 2003.

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biological chemistry**, v. 378, n. 3-4, p. 151-160, 1996.

NAKANO, M. et al. Dispersions of Liquid Crystalline Phases of the Monoolein/Oleic Acid/Pluronic F127 System. **Langmuir**, v. 18, n. 24, p. 9283- 9288, 2002.

NAVARRO, V. P. et al. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista Odontologia da UNESP**. v. 35, n.4, p. 233-38, 2006.

OCHIYA, T. et al. Efficient inhibition of tumor angiogenesis and growth by a synthetic peptide blocking S100A4-methionine aminopeptidase 2 interaction. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, v. 2, p. 15008, 2015.

OLIVEIRA, L. et al. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 385-392, 2006.

O'NEILL, V. J. et al. Oral cancer treatment: developments in chemotherapy and beyond. **British Journal Of Cancer**, v. 87, n. 9, p. 933-937, 2002.

OYAFUSO, M. H. et al. Design and Characterization of Silicone and Surfactant Based Systems for Topical Drug Delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 817-826, 2015.

PANOMSUK, S. Development of benzalkonium chloride thin films for mucoadhesive buccal application. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)**, v. 40, p. 29-32, 2016.

PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.309, p.44-50, 2006.

PATEL, R.; PATEL, T. N. Liquid crystals and their application in the field of drug delivery. In: FANUN, M. **Colloids in Drug Delivery**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p.311-336.

PATEL, V. F. et al. Advances in oral transmucosal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 106-116, 2011.

PENG, L. et al. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v.45, p.108-111, 2005.

PERCHYONOK, V. T. et al. Alternative chitosan based drug delivery system to fight oral mucositis: synergy of conventional and bioactives towards the optimal solution. **Current Nanoscience**, v. 8, p. 541-547, 2012.

PEREIRA, A. et al. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 1, p. 81-6, 2005.

PERIOLI, L. et al. Rheological and functional characterization of new antiinflammatory delivery systems designed for buccal administration. **International journal of pharmaceutics**, v. 356, n. 1, p. 19-28, 2008.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

PETERSON, J. T. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. **Heart Failure Reviews**, v. 9, n. 1, p. 63-79, 2004.

PINHEIRO, J. J. V. Estudo imuno-histoquímico e zimográfico das metaloproteínas da matriz 1, 2 e 9 no ameloblastoma/immunohistochemical and zymographic study of matrix metalloproteinases 1,2 and 9 in ameloblastoma [Monografia para obtenção do grau de Doutor]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2002

PUND, S. et al. Improvement of anti-inflammatory and anti-angiogenic activity of berberine by novel rapid dissolving nanoemulsifying technique. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 307-314, 2014.

QIN, M. et al. Methylene blue covalently loaded polyacrylamide nanoparticles for enhanced tumor-targeted photodynamic therapy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 832-841, 2011.

RAVAL, K. M. et al. Microbial biotransformation: Pharmaceutical peptides. **Journal of Biological and Food Science Research**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2012.

REIS, S. et al. Fatores de risco do câncer da cavidade oral e da orofaringe. I. Fumo, álcool e outros determinantes. **RPG Revista da Pós Graduação**, v. 4, n. 2, p. 127-32, 1997.

REPKA, M. A.; CHEN, L.-L.; CHAN, R. S. Buccal Drug Delivery. In: WILSON, C. G.; CROWLEY, P. J. **Controlled Release in Oral Drug Delivery**. New York: Springer, 2010. p.329-359.

RICARDO, Juan; GESSER, José C.; DOMINGOS, Josiel B. CARACTERIZAÇÃO DE POLIETILENOIMINA DERIVATIZADA COM REAGENTES ACETILANTE E METILANTE COMO MODELO DE ENZIMA ARTIFICIAL (SYNZYME).

RODRÍGUEZ-CABALLERO, A. et al. Cancer treatment-induced oral mucositis: a critical review. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 2, p. 225-238, 2012.

ROSSETTI, F. C. et al. Analysis of Liquid Crystalline Nanoparticles by Small Angle X-Ray Diffraction: Evaluation of Drug and Pharmaceutical Additives Influence on the Internal Structure. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p 2849–2857, 2012.

ROSSETTI, F.C. et al. Optimization of protoporphyrin ix skin delivery for topical photodynamic therapy: Nanodispersions of liquid-crystalline phase as nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 99-108, 2016

SAGALOWICZ, L. et al. Monoglyceride selfassembly structures as delivery vehicles. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 204-214, 2006.

SALMAZI, R. et al. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 4815, 2015.

SAMY, N. A. et al. Effect of methylene blue-mediated photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. **Lasers in medical science**, v. 30, n. 1, p. 109-115, 2015.

SANKARANARAYANAN, R. et al. Screening for Oral Cancer. In: **Contemporary Oral Oncology**. Springer International Publishing, 2017. p. 423-444.

SARAIVA, N. et al. Fatores de risco para o câncer bucal. **Arquivos em Odontologia**, v. 40, n. 1, p. 19-32, 2004.

SARCIAUX, J. M. et al. Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 120, p. 127-136, 1995.

SCHÄFER, P. et al. Methylene blue-and thiol-based oxygen depletion for super-resolution imaging. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 6, p. 3393-3400, 2013.

SCHÄFER, P. et al. Methylene blue-and thiol-based oxygen depletion for super-resolution imaging. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 6, p. 3393-3400, 2013.

SCHMITT, F. et al. Efficient photodynamic therapy of cancer using chemotherapeutic porphyrin-ruthenium metalla-cubes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.22, n.1, p.178-80, 2012.

SENEL, S. et al. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, n.197, p.203, 2000.

SENEL, S. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. **Journal of Controlled Release**. v. 72, n. 1-3., p. 133-144, 2001.

ŞENEL, S.; HINCAL, A. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. **Journal of Controlled Release**, v. 72, n. 1, p. 133-144, 2001.

SHAH, J. C. et al. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 229-250, 2001.

SHOJAEI, A. H. et al. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 15-30, 1998.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 8, 2002.

SILVA, C. et al. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 8, 2002.

SILVA, H. et al. Surfactant-based Transdermal System for Fluconazole Skin Delivery. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 5, n. 231, p. 2, 2014.

SIMPLICIO, F. et al. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

SINEVICI, N. et al. Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. **Oral Oncology**, v. 61, p. 12-18, 2016.

SMART, J. D. et al. The retention of C-labelled poly(acrylic acids) on gastric and oesophageal mucosa: an in vitro study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.20, n.6, p.83-90, 2003.

SOUZA, A. et al. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.

SPERANDIO, F. F. et al. Photodynamic therapy for the treatment of recurrent herpes labialis: preliminary results. **General Dentistry**, v. 57, n. 4, p. 415-419, 2009.

STORPIRTIS, S. et al. In vitro evaluation of dissolution properties and degradation products of omeprazole in enteric-coated pellets. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 24, n. 11, p. 1101-1107, 1998

SUOJANEN, J. Studies on Matrix Metalloproteinase (MMP-2, -9, and -14) and β 2 Integrin Targeting as Potential Anticancer Therapeutics. 2009. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - University of Helsinki, 2009.

TANG, W. et al. Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 369, n. 2, p. 579-583, 2008.

TARDIVO J. P. et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

THOMAS, E. et al. New paradigms in adjuvant systemic therapy of breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 10, n.1, p. 75-89, 2003.

TORRES-PEREIRA, C. C. et al. Abordagem do câncer da boca: uma estratégia para os níveis primário e secundário de atenção em saúde. **Cadernos da Saúde Pública**, v. 28, p. s30-s39, 2012.

URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.

VAN DER LUBBEN, I. M. et al. In vivo uptake of chitosan microparticles by murine Peyer's patches; visualization studies using confocal laser scanning microscopy and immunohistochemistry. **Journal of Drug Targeting**, v. 9, p. 39–47, 2001.

VANACLOCHA, V. et al. Photodynamic therapy in the treatment of brain tumours. A feasibility study. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 12, n. 3, p. 422-427, 2015.

VELLOSO, N. V. et al. Aluminum-phthalocyanine chloride-based photodynamic therapy inhibits PI3K/Akt/Mtor in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. **Chemotherapy**. v.1, n.5, 2012.

VELMURUGAN, S. et al. Buccal penetration enhancers-an overview. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 3, p. 39-47, 2013.

VERLY, R. M. **Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos**. 2010. 182f. Tese(Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química., Belo Horizonte, 2010.

VILAÇA, N. et al. Potentiation of 5-fluorouracil encapsulated in zeolites as drug delivery systems for in vitro models of colorectal carcinoma. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 237-244, 2013.

VIRKUTYTE, J. et al. Visible light induced photobleaching of methylene blue over melamine-doped TiO₂ nanocatalyst. **Nanoscale**, v.2, n.7, 2010.

VROEGE, G. et al. Phase transitions in lyotropic colloidal and polymer liquid crystals. **Reports on Progress in Physics**, v. 55, n. 8, p. 1241, 1992.

WAGNER, M. et al. Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. **Clinical and experimental dermatology**, v. 37, n. 5, p. 527-533, 2012.

WANG, H. et al. Binding of sodium dodecyl sulfate with linear and branched polyethyleneimines in aqueous solution at different pH values. **Langmuir**, v. 22, n. 4, p. 1526-1533, 2006.

WHO - World Health Organization. "Cancer" (2016). Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 31/03/2016.

YAGHMUR, A. et al. Effects of Pressure and Temperature on the Self-Assembled Fully Hydrated Nanostructures of Monoolein–Oil Systems. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 1177- 1185, 2009.

YAGHMUR, A. et al. Emulsified Microemulsions and Oil-Containing Liquid Crystalline Phases. **Langmuir**, v. 21, n. 2, p. 569-577, 2004.

YAPRAK, K. et al. Benzydamine hydrochloride buccal bioadhesive gels designed for oral ulcers: preparation, rheological, textural, mucoadhesive and release properties. **Pharmaceutical development and technology**, v. 14, n. 6, p. 623-631, 2009.

YARIV, D. et al. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, p. 185–192, 2010.

Zeng N. et al. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded DSPE-PEG-liquid crystalline nanoparticles (LCNPs) for improved bioavailability. **International journal of pharmaceutics**, v. 424, n. 1, p. 58-66, 2012.

ZHANG, H. et al. Advances in the formulations of non-injection administration of docetaxel. **Journal of Drug Targeting**, v. 22, n. 2, p. 87-94, 2014.

ZHOU, X. H. Overcoming enzymatic and absorption barriers to nonparenterally administered protein and peptide drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 29, p. 239-252, 1994.

ZHOU, X. H., LI WAN PO, A. Peptide and protein drugs: I. Therapeutic applications, absorption and parenteral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 75, p. 97-115, 1991.

ZOU, W. et al. Studies on bioadhesive PLGA nanoparticles: A promising gene delivery system for efficient gene therapy to lung cancer. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v.370, n.3, p.187-195, 2009