

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BRUNO FONSECA-SANTOS

**SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS
MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO BUCAL DE CURCUMINA
NO TRATAMENTO DO CÂNCER BUCAL**

Araraquara, SP

2015

BRUNO FONSECA-SANTOS

**SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS
MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO BUCAL DE CURCUMINA
NO TRATAMENTO DO CÂNCER BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Prof. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Araraquara, SP

Fevereiro de 2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F676s

Fonseca-Santos, Bruno

Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina no tratamento do câncer bucal / Bruno Fonseca-Santos. — Araraquara, 2015
116 f.: grafs, tabs

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Marlus Chorilli

Coorientador: Maria Palmira Daflon Gremião

1. Cristais líquidos liotrópicos. 2. Câncer bucal. 3. Sistemas precursores de cristais líquidos. 4. Mucoadesão. 5. Curcumina. 6. Administração bucal. I. Chorilli, Marlus., orient. II. Gremião, Maria Palmira Daflon, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

“SISTEMAS PRECURSORES DE CRISTAIS LÍQUIDOS MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO BUCAL DE CURCUMINA NO TRATAMENTO DO CÂNCER BUCAL”

BRUNO FONSECA-SANTOS

Dissertação de Mestrado apresentada e aprovada pela Comissão Julgadora em sessão realizada aos dezenove dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e quinze.

Prof. Dr. Marlus Chorilli (FCF – UNESP) - Presidente e Orientador

Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão Pereira – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Araraquara - UNESP

Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

*Dedico aos meus pais
com todo meu amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Não foi fácil chegar até onde cheguei. É inegável dizer da presença de **Deus** na minha vida e suas bênçãos sobre ela. Cheguei até aqui por Tua vontade.

Ao meu orientador e amigo, **Marlus Chorilli**, pela oportunidade de poder realizar um sonho e por me delegar essa tarefa árdua. Obrigado por me ensinar, proporcionar a troca incansável de conhecimentos e pela confiança depositada.

A minha coorientadora e amiga, **Maria Palmira Daflon Gremião**, por me ensinar, me questionar, me instigar e fazer com que eu buscasse as respostas científicas que eu precisava.

Não posso esquecer de agradecer à minha Mestre, **Ruth Meri Lucinda Silva** por me proporcionar um dia a abertura das portas do seu laboratório para que eu pudesse descobrir esse dom, que faço com tanto amor, chamado Ciência, e pelo seu incentivo para minha vinda à Araraquara.

Aos professores **Marco Vinícius Chaud** e **Marilisa Guimarães Lara** pelas sugestões tão significativas no Exame Geral de Qualificação.

Aos professores **Nádia Bou-Chacra** e **José Fernando Brandão** pelas contribuições tão significativas no Exame de Defesa.

Agradeço aos **colegas do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica** da FCF/Unesp.

Em especial aos amigos que eu fiz nessa jornada. Companheiros de tantas lutas e vitórias. Obrigado à **Alice Haddad, Aline Martins, Ana Luiza Souza, Andressa Fujimura, Caio Castilho, Charlene Kiill, Cristiane Pissinato, Flávia Chiva, Flávio Campos, Lílian Barbassa, Jovan Durán, Juliana Reis, Leonardo Mizziara, Mirela Garcia e Valéria Cardoso**. Amigos existem por todo Universo!

Agradecimentos

À minha amiga de longa data, **Victória Moraes**, que considero a super-amiga! Obrigado por estar comigo em todos os momentos desde a época do guaraná com rolha! Tua amizade é essencial pra mim!

Meus agradecimentos a melhor amiga, **Andréia Meneguim**. Obrigado por me mostrar o caminho da Espiritualidade, pelos conselhos, pela ajuda e pelo carinho. Você se tornou especial e essencial na minha vida.

O agradecimento para a japonesa mais querida, **Márcia Oyafuso**. Obrigado por ter me ensinado a usar os equipamentos e pela troca de conhecimentos. Você é uma pessoa muito determinada e uma fonte de inspiração! Você reforçou aquela ideia: *“ninguém faz pesquisa sozinho!”*

Não posso esquecer de você, **Giovana Calixto**, por ser essa pessoa tão solícita e por ter me ajudado no começo da pesquisa.

E o agradecimento mais fundamental de todos. Vocês que me deram a vida, condições e principalmente amor. Nunca me deixaram passar necessidade e sempre me incentivaram aos estudos. Dedico a vocês, **mamãe e papai**.

Ao **Marcos Antônio Nenê** pelo carinho, amor, dedicação e pelo apoio. Meu muito obrigado!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida nos primeiros 4 meses.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento dessa pesquisa e auxílio financeiro, sob processo nº 13/03746-3.

Ao pessoal da Seção Técnica de Pós-Graduação: **Claudia Molina, Daniela Oliveira, Flávia de Jesus e Joyce Romero**.

.

Bruno Fonseca-Santos

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças à Deus não sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

RESUMO

FONSECA-SANTOS, B. **Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de curcumina no tratamento do câncer bucal**. 2015. 115f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

O câncer bucal é uma doença altamente incidente na população mundial, podendo provocar deformidades faciais e morte. O tratamento de escolha envolve a administração de quimioterápicos, que podem apresentar ação citotóxica também sobre células saudáveis, diminuindo significativamente a qualidade e sobrevida dos pacientes. A curcumina, composto de ocorrência natural isolado dos rizomas da *Curcuma longa*, tem apresentado atividade no tratamento do câncer bucal, atuando sobre o fator nuclear kappa-beta (NF- κ B), que medeia a expressão de genes que estão envolvidos na promoção de tumores, angiogênese e metástases. No entanto, seu uso clínico enfrenta muitos desafios devido às suas características físico-químicas e baixa biodisponibilidade oral. Assim, sua incorporação em sistemas nanoestruturados precursores de cristais líquidos (SPCL) acrescidos de adjuvantes poliméricos mucoadesivos para administração bucal demonstra ser uma opção interessante para viabilizar o seu uso, uma vez que estes sistemas conseguem proteger o fármaco da degradação e aumentar o tempo de permanência da formulação no ambiente bucal, possibilitando uma liberação controlada no local específico de ação. O objetivo deste trabalho foi desenvolver SPCL contendo curcumina para a administração bucal visando a otimização do tratamento câncer bucal. O delineamento dos sistemas se baseou na construção de diagramas ternários de fases pela mistura de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e utilizando fase aquosa adicionadas de dispersões de quitosana, poloxâmero e uma mistura binária de quitosana e poloxâmero. Entretanto, a utilização de dispersão de quitosana na fase aquosa gerou sistemas instáveis e essa estabilidade pôde ser melhorada com a adição de poloxâmero juntamente com a quitosana. As formulações foram caracterizadas macroscopicamente, por microscopia de luz polarizada, espalhamento de raio-x à baixo ângulo (SAXS), reologia oscilatória, análise de textura e análise da mucoadesão *in vitro*. A MLP mostrou que os sistemas formados foram de mesofase lamelar e hexagonal, os quais foram confirmados por SAXS. Os sistemas demonstraram serem viscosos para mesofases lamelares e serem elásticos para mesofases hexagonais, indicando a estruturação dos sistemas. Para os ensaios de textura, a adição de polímeros na fase aquosa levou a um aumento dos parâmetros de dureza, compressão e adesividade; e demonstrou um efeito sinérgico na mucoadesão *in vitro*. Para avaliar a capacidade de transição de fase, os sistemas foram diluídos em saliva artificial. A MPL mostrou uma transição de fase de lamelar para hexagonal, além do aumento dos valores de módulo de elasticidade na análise reológica. Os valores de textura mostraram ser crescentes e dependentes da adição de saliva aos sistemas, assim como a força de destacamento foi dependente da diluição. O método analítico por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) foi desenvolvido para quantificar a curcumina nos ensaios de performance. No ensaio de liberação e permeação *in vitro* não foi detectada a curcumina no meio acceptor, indicando que o fármaco não liberou da matriz e nem foi capaz de permear através da mucosa. Por outro lado, a curcumina foi capaz de reter no tecido esofágico em maior proporção para o sistema de mesofase lamelar do que para hexagonal. O presente trabalho permitiu obter SPCL com características físico-químicas, reológicas, mecânicas e mucoadesivas adequadas para a via bucal e com potencial como veículo para sistema de liberação para esta via de administração.

Palavras-chave: Cristais líquidos liotrópicos. Sistemas precursores de cristais líquidos. Mucoadesão. Curcumina. Câncer bucal. Administração bucal.

ABSTRACT

FONSECA-SANTOS, B. **Mucoadhesive precursor systems of liquid crystals for buccal administration of curcumin in the treatment of oral cancer**. 2015. 115f. Dissertation (Master). School of Pharmaceutics Sciences – São Paulo State University, Araraquara, 2015.

Oral cancer is a highly incident disease in the world population and it can causes facial deformities and death. The choice treatment is costly and usually involves the administration of chemotherapy, which may have cytotoxic action also on healthy cells, which affects significantly the quality and survival of patients. Curcumin, naturally occurring compound isolated from the rhizomes of *Curcuma longa*, it has shown activity in the treatment of oral cancer, it acts on the nuclear factor kappa beta (NF- κ B), which it mediates expression of genes that are involved in promoting tumors, angiogenesis and metastasis. However, its clinical use shows several challenges, mainly due to its physicochemical characteristics and low oral bioavailability. Thus, when incorporated in nanostructured systems precursors of liquid cristas (SPLC) added of a mucoadhesive polymer adjuvants, shows to be an interesting option to enable its use in the treatment of oral cancer, since these systems can protect the drug against degradation and to increase the residence time of the formulation in the oral environment, allowing a controlled release on an specific site of action. The aim of this study was to develop LCSP containing curcumin for oral administration in order to optimize the oral cancer treatment. The design of the systems was based on the construction of ternary phase diagrams by mixing PPG-5-CETETH-20, oleic acid and using aqueous dispersions added chitosan, poloxamer and a binary mixture of chitosan and poloxamer. However, the use of chitosan dispersion in the aqueous phase produced unstable systems and the stability can be improved with the addition of poloxamer with chitosan. The formulations were characterized by macroscopic appearance, polarized light microscopy (PLM), small angle X-ray scattering (SAXS), oscillatory rheology, texture analysis and analysis of *in vitro* mucoadhesion. The MLP showed that systems were formed by lamellar and hexagonal mesophase and this result was confirmed by SAXS. The systems show a viscous behavior to lamellar mesophases and an elastic behavior to hexagonal mesophases. For texture analysis, addition polymers into the aqueous phase led to increase of these parameters and demonstrated a synergistic effect of *in vitro* mucoadhesion. To evaluate the ability of phase transition, the systems were diluted in artificial saliva. MPL showed a lamellar to hexagonal phase transition, besides the increase of the elastic modulus by rheological analysis. The texture values shown to be dependent on the increasing addition of saliva to the systems, as well as the force of mucoadhesion exhibited values dependent dilution. The analytical method for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was developed to determine curcumin in performance tests. *In vitro* release and permeation test, it was not detected curcumin in the acceptor medium, indicating that the drug did not release of the matrix and neither was able to permeate through the mucosa. On the other hand, curcumin was able to retain the esophageal tissue in a greater proportion to lamellar mesophase than hexagonal system. This work allowed to obtain LCSP with appropriate physical-chemical, rheological, mechanical and mucoadhesive properties for buccal administration, suggesting its potential use as a vehicle for delivery system for this route.

Keywords: Lyotropic liquid crystals. Systems precursors of liquid crystal. Mudoadhesion. Curcumin. Oral cancer. Buccal administration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da curcumina.....	22
Figura 2. Desenho esquemático do rearranjo molecular de cristais líquidos termotrópicos, sendo: mesofase nemática (A), esméctica (B) e colestérica (C).	26
Figura 3. Representações esquemáticas de fases líquidas cristalinas formadas por anfifílicos em água, sendo lamelar (a), hexagonal (b) e cúbica (c).	27
Figura 4. Formação de estruturas líquido-cristalinas baseada no Parâmetro de Empactamento Crítico (PEC) do tensoativo.	28
Figura 5. Representação esquemática dos diferentes revestimentos da mucosa da boca (A). Diagrama esquemático das estruturas presentes na mucosa bucal (B). ...	30
Figura 6. Mecanismos de transporte de moléculas pela via bucal, sendo (1) transporte transcelular ou intracelular e (2) transporte intercelular ou paracelular.	33
Figura 7. Dois estágios do processo de mucoadesão: estágio de contato e de consolidação.	36
Figura 8. Representação ilustrativa do texturômetro e as adaptações realizadas para o teste TPA. A1: resistência à compressão; A2: adesão; A3: segundo ciclo de compressão.	46
Figura 9. Representação ilustrativa do texturômetro e as adaptações realizadas para o teste de mucoadesão <i>in vitro</i>	48
Figura 10. Aspecto visual das formulações classificadas como SF, STL, STBV, STAB, EML e EMV a partir dos diagramas ternários.	54
Figura 11. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água (a), contendo poloxâmero (b), quitosana (c) e quitosana e poloxâmero (d).	56
Figura 12. Fotomicrografias obtidas por MLP das formulações sendo campo escuro (A), cruzes de Malta (B), sistema composto por Cruzes de Malta e estrias (C) e apenas estrias (D).	58
Figura 13. Mudança de transição de fase dos sistemas liotrópicos selecionados em relação à proporção de fase aquosa e oleosa.	60
Figura 14. Aspecto macroscópico das formulações contendo quitosana (A) e com polímeros de quitosana e poloxâmero (B) após 15 dias do preparo. Gráfico mostrando o potencial zeta (mV) em função do tempo.	61
Figura 15. Curvas de SAXS das formulações selecionadas de cristais líquidos com e sem quitosana e poloxâmero.	63
Figura 16. Esquema ilustrativo do parâmetro de rede para fases cristalinas lamelares e hexagonais.	64
Figura 17. Espectro mecânico do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') em função da frequência para as formulações contendo fase aquosa sem polímeros (A) e com polímeros (B).	66
Figura 18. Gráficos de barra para as medidas de dureza, área de compressão, área de adesividade e coesão obtidos pela metodologia de TPA. Teste t unilateral com $\alpha = 0,05$, sendo * $p < 0,05$ para grupo sem polímeros na FA (F2 e F3); ** $p < 0,05$ para grupo com polímeros na FA (F2QP e F3QP); # $p < 0,05$ para grupo F2 vs. F2QP; § $p < 0,05$ para grupo F3 vs. F3QP.	69
Figura 19. Gráficos de barra para as medidas de força e área de mucoadesão obtidos pela metodologia de mucoadesão <i>in vitro</i> . Teste t unilateral com $\alpha = 0,05$, sendo * $p < 0,05$ para grupo sem polímeros (F2 e F3); ** $p < 0,05$ para grupo sem	

polímeros (F2QP e F3QP); # $p < 0,05$ para grupo F2 vs. F2QP; § $p < 0,05$ para grupo F3 vs. F3QP.	72
Figura 20. Diagrama de fase ternário mostrando a transição de viscosidade para as formulações percussoras (SP1, SP2 e SP3) de cristais líquidos.	75
Figura 21. Aspecto macroscópico das formulações diluídas com saliva artivial e MLP obtidas das formulações de SPCL.	76
Figura 22. Espectro mecânico do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') em função da frequência para os SPCL contendo ou não contendo fármaco.	77
Figura 23. Gráficos de barra para as medidas de dureza, área de compressão, área de adesividade e coesão obtidos pela metodologia de TPA das formulações de SPCL contendo e não contendo curcumina.	79
Figura 24. Gráficos de barra para as medidas de força e área de mucoadesão obtidos pela metodologia de mucoadesão <i>in vitro</i> dos SPCL contendo e não contendo curcumina.	81
Figura 25. Cromatograma da curcumina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em metanol e do solvente metanol grau HPLC.	83
Figura 26. Curvas padrão de curcumina em metanol com intervalo de concentração compreendido de $0,5 - 75,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtida por CLAE.	83
Figura 27. Cromatograma da solução branca de extrato metanólico da mucosa e tampão fosfato (TP) contendo LSS 0,5% e das soluções contaminadas com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de curcumina.	85
Figura 28. Perfil de liberação (%) da curcumina dissolvida em ácido oleico pelo período de 12 horas.	87
Figura 29. Porcentagem de retenção de curcumina em mucosa suína após 12 horas do teste de liberação <i>ex vivo</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de $q_{\max}$, razão entre as distâncias interplanares, distância entre planos (d) e aresta do hexágono (a) para as formulações estudadas.....	64
Tabela 2. Valores de regressão linear (r), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) das formulações contendo fase aquosa com e sem polímeros.	68
Tabela 3. Valores de regressão linear (r), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) dos SPCL contendo ou não fármaco.	78
Tabela 4. Precisão intra-corrida e precisão intermediária do método avaliado em concentrações diferentes de curcumina.....	84
Tabela 5. Valores da recuperação da curcumina nas matrizes estudadas, TP contendo LSS 0,5% e mucosa esofágica de suína, utilizando o método de adição do padrão.	86
Tabela 6. Constante (k) e coeficientes de regressão ajustado dos modelos aplicado ao ensaio de liberação da curcumina em ácido oleico.	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resumo geral de sistemas líquido-cristalinos, sua composição, estrutura formada e fármaco, com aplicabilidade para a via bucal.....	39
Quadro 2. Composição (%) dos sistemas selecionados para a caracterização físico-química.....	44
Quadro 3. Composição da saliva artificial.	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1	Câncer bucal	19
3.2	Curcumina.....	21
3.3	Cristais líquidos	25
3.4	Estratégias para liberação de fármacos utilizando a via bucal.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Materiais.....	41
4.1.1	Reagentes.....	41
4.1.2	Equipamentos	41
4.2	Métodos	42
4.2.1	Preparo das dispersões	42
4.2.1.1	Preparo da dispersão de quitosana	42
4.2.1.2	Preparo da dispersão de poloxâmero.....	42
4.2.1.3	Preparo da dispersão de poloxâmero e quitosana	42
4.2.2	Construção dos diagramas de fase ternários.....	42
4.2.3	Seleção das formulações a partir do diagrama ternário.....	43
4.2.3.1	Microscopia de luz polarizada.....	44
4.2.3.2	Espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS)	44
4.2.3.3	Análise por reologia oscilatória	45
4.2.3.4	Análise do perfil de textura	45
4.2.3.5	Análise das propriedades mucoadesivas	47
4.2.3.6	Preparação da coleta da saliva humana.....	47
4.2.3.7	Obtenção da mucosa esofágica de porco	47
4.2.3.8	Avaliação <i>in vitro</i> da força de mucoadesão	47
4.2.3.9	Avaliação do potencial zeta em função do tempo após o preparo das formulações	48
4.2.4	Estudo do potencial precursor de fases dos cristais líquidos em contato com saliva artificial.....	49
4.2.4.1	Caracterização físico-química, reológica, de textura e das propriedades mucoadesivas.....	49

4.2.5	Desenvolvimento do método analítico por CLAE para quantificar a curcumina	49
4.2.5.1	Seletividade	50
4.2.5.2	Linearidade	50
4.2.5.3	Precisão	50
4.2.5.4	Exatidão	50
4.2.5.5	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	51
4.2.6	Ensaio de avaliação da performance dos SPCL	51
4.2.6.1	Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	51
4.2.6.2	Ensaio de permeação <i>ex vivo</i>	52
4.2.6.3	Ensaio de retenção em mucosa suína	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Construção dos diagramas ternários	54
5.2	Seleção dos sistemas líquidos cristalinos	58
5.2.1	Caracterização por espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS)	62
5.2.2	Caracterização reológica dos sistemas	65
5.2.2.1	Reologia oscilatória	65
5.2.3	Caracterização mecânica dos sistemas	68
5.2.3.1	Análise do perfil de textura (TPA)	68
5.2.4	Estudo de mucoadesão <i>in vitro</i>	71
5.2.5	Discussão geral das propriedades físico-químicas, reológicas, mecânicas e mucoadesivas de sistemas líquidos cristalinos	72
5.3	Estudo de desenvolvimento de SPCL com aplicabilidade para a via bucal	74
5.3.1	Caracterização reológica dos sistemas	76
5.3.1.1	Reologia oscilatória	76
5.3.2	Caracterização mecânica dos SPCL	78
5.3.2.1	Análise do perfil de textura (TPA)	78
5.3.3	Estudo de mucoadesão <i>in vitro</i> dos SPCL	80
5.4	Desenvolvimento do método analítico por CLAE para determinação de curcumina	82
5.4.1	Avaliação da performance dos SPCL	86
5.4.1.1	Ensaio de liberação <i>ex vivo</i>	86
5.4.1.2	Ensaio de permeação e retenção <i>ex vivo</i>	89
6	Conclusão	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE A - Validação do método analítico por espectroscopia por UV-VISÍVEL quantificar a curcumina (curcuminoides)	114

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, LOZZI & AZEVEDO, 2011). A incidência mundial é de aproximadamente 300 mil novos casos por ano. 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, etilismo e infecções pelo papilomavírus humano (KAMINAGAKURA *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2012).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 apontam a ocorrência de aproximadamente 9.990 novos casos de câncer bucal em homens e 4.180 em mulheres (TORRES-PEREIRA *et al.*, 2012). Esses valores correspondem a um risco estimado de 10 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (TORRES-PEREIRA *et al.*, 2012; CSIKAR *et al.*, 2013).

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 da área de Pesquisa e Desenvolvimento estão se empenhando, cada vez mais, na descoberta de novas moléculas bioativas para uso na terapia antitumoral. Neste contexto, as fontes naturais estão disponíveis em abundância e oferecem ótimas possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. De fato, mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer (HARVEY, 2008).

A curcumina é um composto de ocorrência natural isolado como um pigmento amarelo do açafrão dos rizomas da *Curcuma longa* L. (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005). Este fármaco tem demonstrado potencial de utilização no tratamento do câncer (ANAND *et al.*, 2008; GOEL, KUNNUMAKKARA & AGGARWAL, 2008; ZLOTOGORSKI *et al.*, 2013), pois inibe o NF- κ B em CEB

(AGGARWAL *et al.*, 2004), o qual está envolvido diretamente com a tumorigênese, sendo ativado por substâncias carcinogênicas, citocinas inflamatórias e fatores de estresse extracelular, que contribuem para o desenvolvimento de câncer de células escamosas orais, podendo levar à angiogênese, invasão tumoral e metástase (BENNERIAH & KARIN, 2011).

O grande potencial farmacológico da curcumina e suas aplicações terapêuticas são limitados principalmente pelas suas características físico-químicas, incluindo baixa solubilidade aquosa em condições de pH ácido e fisiológico, hidrólise rápida em pH alcalino e instabilidade em presença de luz (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005).

Tais limitações apresentadas pela molécula torna a via bucal uma rota atrativa de administração de fármacos incorporados em sistemas de liberação, como veiculados em sistemas líquidos cristalinos, prolongando o seu tempo de residência na mucosa (SHOJAEI, 1998; GRABOVAC, GUGGI & BERNKOP-SCHNURCH, 2005) e possibilitando o tratamento local em lesões malignas (NIELSEN, SCHUBERT & HANSEN, 1998; BHARDWAJ & KUMAR, 2012; HEARNDEN *et al.*, 2012).

Os cristais líquidos pertencem a um estado de matéria com propriedades entre um sólido cristalino e um líquido isotrópico (REINITZER, 1888; SINGH, 2000; HYDE, 2002). Os sistemas precursores de cristais líquidos liotrópicos (SPCL) apresentam uma promissora alternativa de aplicação para a via bucal. Estes sistemas são interessantes para administração bucal, pois podem se apresentar líquidos, facilitando a administração da formulação, por exemplo, em dispositivo seringa.

Ao entrar em contato com o ambiente bucal, o SPCL tem a capacidade de incorporar a saliva, se tornando uma mesofase líquido-cristalina mais viscosa (MALMSTEN, 2007), devido à sua transição de estruturação de uma fase lamelar para a uma mesofase hexagonal ou cúbica, (LEE, YOUNG & KELLAWAY, 2001; BOYD *et al.*, 2006; BRUSCHI *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2013), o que pode promover liberação controlada e, conseqüentemente, resultar em maior mucoadesão da forma farmacêutica no ambiente bucal (LEE, YOUNG & KELLAWAY, 2001; BRUSCHI & DE FREITAS, 2005; MALMSTEN, 2007; BRUSCHI *et al.*, 2008;

GILHOTRA *et al.*, 2014) e maior tempo de residência no local (MALMSTEN, 2007; BODDUPALLI *et al.*, 2010; GILHOTRA *et al.*, 2014).

O uso da quitosana em sistemas de liberação mucoadesivos para administração bucal (DHAWAN, SINGLA & SINHA, 2004; PENDEKAL & TEGGINAMAT, 2012) pode ser justificado pelas interações eletrostáticas do grupo amino da quitosana com os grupos siálicos da mucina na camada de muco (DERJAGUIN, ALENIKOVA & TOPOROV, 1994; PONCHEL *et al.*, 1997; BRAVO-OSUNA *et al.*, 2007; KHUTORYANSKIY, 2011). Este mecanismo se torna importante também no caso de células tumorais, as quais apresentam carga negativa na membrana, em virtude de possuírem fosfatidilserina, um fosfolípido aniônico (HE *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012), resultando em um efeito de interação e liberação no local da lesão.

As vantagens da mucoadesão no desenvolvimento de formas farmacêuticas de administração bucal resultam na capacidade de prolongar o tempo de residência no local de absorção do fármaco, permitindo a sua completa dissolução e posterior absorção. Além disso, o contato mais próximo entre a forma farmacêutica e a membrana absorvente reduz a barreira de difusão e tende a proteger o fármaco da degradação (GRABOVAC, GUGGI & BERNKOP-SCHNURCH, 2005).

O desenvolvimento de SPLC acrescidos de curcumina para administração bucal é, dessa forma, uma aplicação inédita no campo farmacêutico. 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 e os efeitos adversos dos fármacos, sugere-se que a utilização da curcumina incorporada em SPLC mucoadesivos, possa oferecer uma promissora e inexplorada ferramenta nanobiotecnológica para o tratamento do câncer bucal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar o potencial de sistemas precursores de cristais líquidos com propriedades mucoadesivas para a administração bucal de curcumina visando a otimização do tratamento do câncer oral.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar o comportamento de fases da combinação do tensoativo PPG-5-CETETH-20, água, e ácido oleico, acrescidos ou não quitosana e poloxâmero;
- ✓ Caracterizar físico-quimicamente os sistemas líquidos cristalinos de mesofases lamelares e hexagonais;
- ✓ Avaliar o potencial precursor de mesofases de cristais líquidos visando administração bucal;
- ✓ Caracterizar, por técnicas reológicas, mecânicas e de medida da força mucoadesiva, os sistemas estudados;
- ✓ Desenvolver metodologia de quantificação do fármaco por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- ✓ Avaliar a cinética de liberação através da difusão por membrana e permeação das formulações através de mucosa esofágica de porco.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer bucal

Carcinoma de células escamosas (CEB) oral é o sexto tipo de câncer mais comum em ambos os sexos em todo o mundo e a taxa de sobrevivência da doença por cinco anos é de cerca de 50%. CEB é um tumor maligno do epitélio escamoso que reveste a mucosa oral e, por ser maligno, tende rapidamente realizar metástase (JEMAL *et al.*, 2011; SIEGEL, NAISHADHAM & JEMAL, 2013).

Em 2011, o CEB bucal foi responsável por quase 3% de todos os casos de câncer no mundo e sua incidência estimada é de cerca de 275 mil casos por ano, com dois terços desses casos ocorrendo em países em desenvolvimento (JEMAL *et al.*, 2011). Em 2015, são estimados 45.780 novos casos, nos EUA, para ambos os sexos, sendo 31,3% na língua, 28,2% na boca, 33,9% na faringe e 6,6% em outras áreas da cavidade oral. A incidência de morte nos EUA será de 8.650 casos, sendo que 25,3% para câncer na língua, 24,5% para a boca, 30,8% para a faringe e 19,4% para outras áreas da cavidade oral (SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2015).

Estimou-se, para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade oral em homens é o quarto mais frequente nas regiões Sudeste (15,48/100 mil) e Nordeste (7,16/100 mil). Na região Centro-Oeste, é o quinto (8,18/100 mil) e nas regiões Sul (15,21/ 100 mil) e Norte (3,21/ 100 mil), o sexto (INCA, 2014).

As principais causas de câncer bucal são o consumo excessivo de álcool, uso de tabaco (EPSTEIN, ZHANG & ROSIN, 2002; LLEWELLYN, JOHNSON & WARNAKULASURIYA, 2004; CHITAPANARUX *et al.*, 2006) e a exposição à luz solar, que é um fator causal para o câncer dos lábios, semelhante ao câncer de pele (DE ROSA *et al.*, 1999). O papiloma vírus humano (HPV) é também um dos fatores de risco para a causa do câncer de boca (HAFKAMP *et al.*, 2003; RAGIN & TAIOLI, 2007; ZHU *et al.*, 2012).

A prevalência teve um aumento de 5,3 vezes para os homens e um aumento de 2 vezes para as mulheres nas últimas duas décadas (SU *et al.*, 2007), sendo que o número de mortes anuais por câncer bucal aumentou significativamente em

indivíduos do sexo masculino (CHEN *et al.*, 2002; SIEGEL, NAISHADHAM & JEMAL, 2013; SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2015). A taxa de sobrevida em 5 anos para o câncer bucal é de 66%(SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2015), a qual possui relação com mau prognóstico ou o diagnóstico tardio (JEMAL *et al.*, 2011). As taxas de recorrência para CEB variam de 18-76% (SHAH & LYDIATT, 1995) para os pacientes que se submeteram a tratamento padrão, sendo considerada pouco relevante na taxa de sobrevivência (STEELE & MEYERS, 2011).

Os estudos histopatológicos com possíveis investigações prévias de evidência citológica (JOSEPH, 2002; WEINBERG & ESTEFAN, 2002; STEELE & MEYERS, 2011) (ONOFRE *et al.*, 1997; EPSTEIN *et al.*, 2008; KOCH *et al.*, 2011) são importantes no prognóstico, muitas vezes, demorados e dispendiosos. Esses fatores atrasam o diagnóstico e consequentemente o início do tratamento, resultando na redução na taxa de sobrevivência dos pacientes oncológicos (JEMAL *et al.*, 2011).

Os protocolos de tratamento para câncer da cavidade oral são, incluindo a terapia generalizada com base no estágio da doença, a remoção cirúrgica do tumor, a radioterapia, a quimioterapia e quimioterapia de indução, que se inicia antes de qualquer tratamento cirúrgico ou de radioterapia, para a doença avançada (VISSCHER, 2008; HULLMANN & REICHERT, 2011). Nas terapias atuais, alguns fármacos podem ser usados isoladamente ou em combinação para o tratamento de câncer bucal, tais como a cisplatina, cetuximab, fluorouracilo, paclitaxel, docetaxel e metotrexato (CATIMEL *et al.*, 1994; CLAVEL *et al.*, 1994; BACHAUD *et al.*, 1996; ADELSTEIN *et al.*, 2003; BASELGA *et al.*, 2005; BONNER *et al.*, 2006; VERMORKEN *et al.*, 2007; VERMORKEN *et al.*, 2008; HADDAD *et al.*, 2009).

A administração oral de fármacos antineoplásicos é preferida pelos pacientes por sua conveniência e potencial de tratamento ambulatorial. Além disso, a administração oral facilita a exposição prolongada a um agente citotóxico (TERWOGT *et al.*, 1999). No entanto, a baixa solubilidade em fluidos aquosos, baixa permeabilidade e baixa biodisponibilidade dos fármacos são denotados como limitações para quimioterapia oral (DEVALAPALLY, CHAKILAM & AMIJI, 2007; FAHR & LIU, 2007; AGUEROS *et al.*, 2009; GOKCE, OZYAZICI & SOUTO, 2010; ZHANG *et al.*, 2014).

Por outro lado, administração intravenosa é direta, e supera os padrões de absorção variável do trato gastrointestinal, sendo que esta via leva a biodisponibilidade imediata e completa; assim, tem o potencial de ser prejudicial, já que elevadas concentrações de fármacos também são entregues aos tecidos normais (KRUIJTZER, BEIJNEN & SCHELLENS, 2002; MURPHY & MIDDLETON, 2012), causando um maior dano aos tecidos saudáveis e aumento de reações adversas (MURPHY & MIDDLETON, 2012; WELLS *et al.*, 2014), tais como mucosite, xerostomia e infecções na região bucal (WONG, 2014).

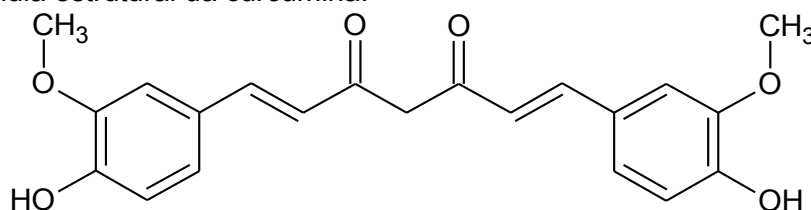
Para superar as limitações das técnicas de tratamento de câncer em curso, a comunidade científica pode utilizar da nanotecnologia para desenvolver sistemas novos e mais eficazes de transporte de fármacos para otimizar rotas de tratamento por diversas vias de administração.

3.2 Curcumina

Curcumina [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] (Figura 1) (LITWINIENKO & INGOLD, 2004) é um dos principais componentes do açafrão, produzido a partir do rizoma da planta *Curcuma longa* (AGGARWAL, KUMAR & BHARTI, 2003).

A curcumina é um produto natural hidrofóbico, que é composta por dois anéis fenólicos, cada um, substituídos com uma funcionalidade éter metoxi em posição *orto*. Os dois anéis fenólicos estão ligados através de um ligante alifático insaturado hepteno em posição *para* que também contém uma funcionalidade α , β dicetona em carbono 3 e 5, sendo que essa funcionalidade de dicetona pode ser submetido à tautomerização reversível entre a forma enólica e cetônica (PAYTON, SANDUSKY & ALWORTH, 2007).

A tautomerização da curcumina ocorre de um modo dependente do pH, com a forma de bis-ceto predominando em soluções ácidas e neutras, e a forma de enol, em soluções alcalinas (SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005).

Figura 1. Fórmula estrutural da curcumina.

A curcumina possui baixa absorção no trato gastrointestinal, baixa biodisponibilidade e metabolização rápida (ANAND *et al.*, 2007), além da dose administrada por via oral ser excretada nas fezes e na urina, sendo pouco detectada no plasma sanguíneo (PAN, HUANG & LIN, 1999). Outro fator limitante é a sua solubilidade, sendo praticamente insolúvel em água ou pH ácido e neutro, além de que em condições de pH alcalino se torna instável levando a degradação, contribuindo para a sua pobre absorção e baixa biodisponibilidade (WAHLSTROM & BLENNOW, 1978; RAVINDRANATH & CHANDRASEKHARA, 1980; RAVINDRANATH & CHANDRASEKHARA, 1981).

Segundo ANSARI *et al.* (2005), a estabilidade da curcumina é aumentada pela redução do pH, devido à manutenção da estrutura dieno conjugada da molécula. Quando o ajuste do pH para valores neutro ou alcalino é realizado, o próton do grupamento fenólico é removido, levando à destruição desta estrutura. O-*trans*-6-(4'-hidroxi-3'-metoxi-fenil)-2,4-dioxo-5-hexenal foi previsto como principal produto de degradação e a vanilina, o ácido ferúlico e o metano-feruloil foram identificados como produtos de degradação minoritários.

Recentemente, a curcumina tem atraído interesse como um agente citotóxico e citostático em potencial, tanto para fins quimiopreventivos quanto quimioterápicos (AGGARWAL, KUMAR & BHARTI, 2003; AGGARWAL & SHISHODIA, 2006). A curcumina pode efetivamente inibir as fases da carcinogênese, incluindo transformação, a iniciação, promoção, invasão, angiogênese e metástase (AGGARWAL, KUMAR & BHARTI, 2003; SHARMA, GESCHER & STEWARD, 2005; SHISHODIA, SETHI & AGGARWAL, 2005; AGGARWAL & SHISHODIA, 2006; SHISHODIA, CHATURVEDI & AGGARWAL, 2007).

Esta molécula exerce uma grande variedade de efeitos farmacológicos no câncer, tais como indução da paragem do ciclo celular (AGGARWAL, KUMAR & BHARTI, 2003), inibição da proliferação e do crescimento celular (AGGARWAL,

KUMAR & BHARTI, 2003; BEEVERS *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2010), inibição da motilidade celular (BEEVERS *et al.*, 2006), indução da apoptose (BEEVERS *et al.*, 2006) e ação anti-inflamatória (GUPTA *et al.*, 2010).

Uma maior atenção tem sido dada ao fator nuclear kappa B (NF- κ B) (AGGARWAL & SHISHODIA, 2004; SUNG *et al.*, 2011), o qual está envolvido na expressão de genes ligados com a promoção de tumores, angiogênese, metástase e resistência aos fármacos antitumorais (GARG & AGGARWAL, 2002), além do baixo fluxo sanguíneo no microambiente tumoral e a hipóxia resultante ativarem o NF- κ B, sendo que a expressão de NF- κ B está ligada com a ativação de fatores de crescimento e de vascularização no sítio tumoral (SETHI, SUNG & AGGARWAL, 2008) levando a maior progressão e crescimento do tumor. GARG & AGGARWAL (2002) relataram que a transcrição de NF- κ B é um alvo importante para desenvolvimento de fármacos antitumorais.

Neste sentido, estudos realizados por AGGARWAL *et al.* (2004) demonstraram que a curcumina é capaz de inibir o NF- κ B em CEB. Sabe-se que o NF- κ B está envolvido diretamente com a tumorigênese, sendo ativado por substâncias carcinogênicas, citocinas inflamatórias e fatores de estresse extracelular, que contribuem para o desenvolvimento de câncer de células escamosas orais, podendo levar à angiogênese, invasão tumoral e metástase (BEN-NERIAH & KARIN, 2011).

KIM *et al.* (2012) estudaram a indução de autofagia, pela formação de vacúolos autofágicos, após a exposição a curcumina. A autofagia é um fenômeno envolvendo o sequestro e de degradação de organelas intracelular em lisossomas. Alguns estudos têm indicado um papel importante do processo de autofagia na terapia atual do câncer (BURSCH *et al.*, 2000; TSUJIMOTO & SHIMIZU, 2005; OUYANG *et al.*, 2012).

LIAO *et al.* (2011) verificaram uma redução significativa na viabilidade das células de carcinoma oral tratadas com curcumina, através do processo de indução de apoptose e também associada com a regulação negativa de Notch-1 e NF- κ B. Dessa forma, a regulação negativa de Notch-1 pela curcumina pode ser uma abordagem eficaz, já que causam também regulação negativa de NF- κ B, o que resulta na inibição do crescimento celular e invasão. Estes resultados sugerem que a atividade antitumoral da curcumina é mediada através de um mecanismo novo envolvendo a inativação de Notch-1 e das vias sinalização de NF- κ B.

Estudos realizados por SHARMA *et al.* (2006) mostraram que a exposição ao extrato de tabaco sem fumaça resultou no aumento da expressão e ativação do NF-kB e da ciclooxigenase-2 (COX-2) em sistemas de células bucais humanas *in vitro*. Entretanto, o tratamento das células expostas com curcumina levou a uma diminuição da expressão de NF-kB e da COX-2.

O primeiro estudo conduzido sobre o efeito da curcumina em células tumorais bucais foi realizado por ELATTAR & VIRJI (2000). Neste estudo, foi utilizada linhagem celular humana de carcinoma de células escamosas (SSC-25) e foi avaliado que a curcumina induziu a inibição significativa dependente da dose, tanto no crescimento celular, como também na proliferação celular. Com base nestes resultados, concluiu-se que a curcumina é consideravelmente mais potente do que a quercetina, enquanto a cisplatina é cinco vezes mais potente do que a curcumina na inibição do crescimento de SCC-25.

Em resumo, vários estudos relatam a ação curcumina na inibição de NF-kB e que este fator participa na expressão de genes envolvidos em respostas inflamatórias e imunes, na proliferação celular e sobrevivência de células (KARIN, 2006). Os níveis de NF-kB aumentam gradualmente a partir da fase de lesão pré-maligna até sua progressão ao câncer invasivo, indicando um papel importante para as fases iniciais da carcinogênese (BINDHU *et al.*, 2006; KARIN, 2006). Em CEB, a redução da atividade de NF-kB resulta em baixos níveis de interleucina (IL), incluindo os níveis de IL-2, IL-6 e IL-8. Além disso, a IL-8 desempenha um papel importante na indução do processo de angiogênese (RICHMOND, 2002) e consequentemente no crescimento tumoral.

O grande potencial farmacológico da curcumina e suas aplicações terapêuticas são limitados principalmente pelas suas características físico-químicas, como a lipofilicidade, que resulta em restrições farmacocinéticas, tais como baixa absorção por via oral, metabolismo hepático extenso e rápida eliminação (SHARMA & STEWARD, 2007; ANAND *et al.*, 2008). Dessa forma, o emprego de sistemas de liberação controlada e de vias alternativas de administração podem ser estratégias atraentes para a sua administração (BHARDWAJ & KUMAR, 2012).

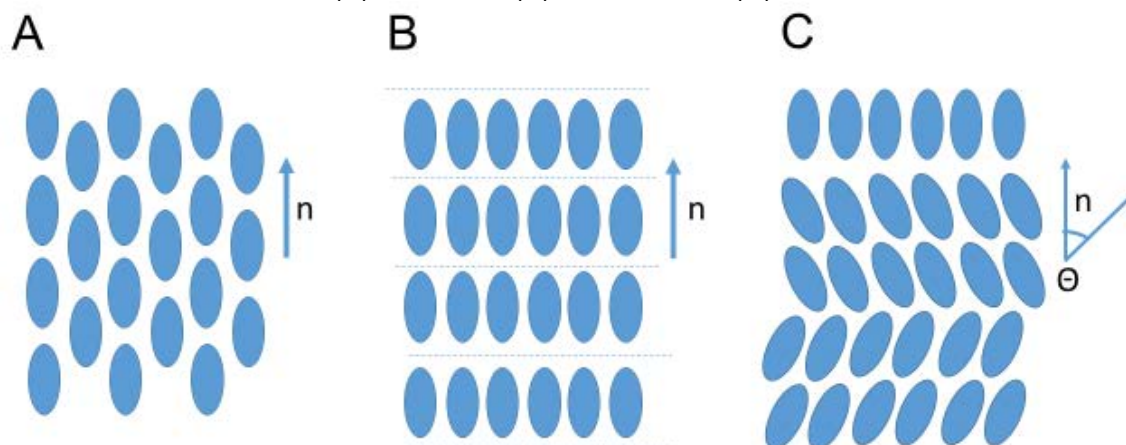
3.3 Cristais líquidos

Os cristais líquidos (LCs) são mesofases auto-organizadas com propriedades intermédias entre sólidos cristalinos e líquidos isotrópicos (LARSSON, 1989; SINGH, 2000; MALMSTEN, 2002; MALMSTEN, 2007; PATEL & PATEL, 2010).

LCs são classificados como termotrópicos ou liotrópicos dependendo do parâmetro físico-químico responsável pela sua transição de mesofase. A formação de mesofases pode ser delineada pelo aumento da temperatura ou pela adição de um solvente, que corresponde à diferenciação entre termotrópicos e liotrópicos, respectivamente (MALMSTEN, 2007; PATEL & PATEL, 2010).

Sistemas termotrópicos são classificados como nemáticos, esméticos e colestéricos (FLORENCE & ATTWOOD, 2006; PATEL & PATEL, 2010) os quais são apresentados na Figura 2. A fase nemática tem uma estrutura simples quando comparada com todas as mesofases e é caracterizada pela ordem de orientação uni-direcional das moléculas em virtude da correlação do eixo principal molecular (DONNIO *et al.*, 2007), mas não são organizadas em camadas (FLORENCE & ATTWOOD, 2006). Já a fase colestérica não apresenta ordem posicional de longo alcance, mas apresenta ordem orientacional. Os colestéricos se assemelham aos nemáticos, a diferença é que a ordem orientacional, em uma escala maior, varia seguindo uma conformação helicoidal (FLORENCE & ATTWOOD, 2006). A fase esmética é caracterizada por apresentar uma distribuição espacial com ordem superior à dos nemáticos e colestéricos (PATEL & PATEL, 2010). As moléculas são distribuídas em camadas com um espaçamento bem definido. Apesar das camadas possuírem uma grande regularidade entre si, não há uma regularidade no posicionamento das moléculas em cada camada (FLORENCE & ATTWOOD, 2006).

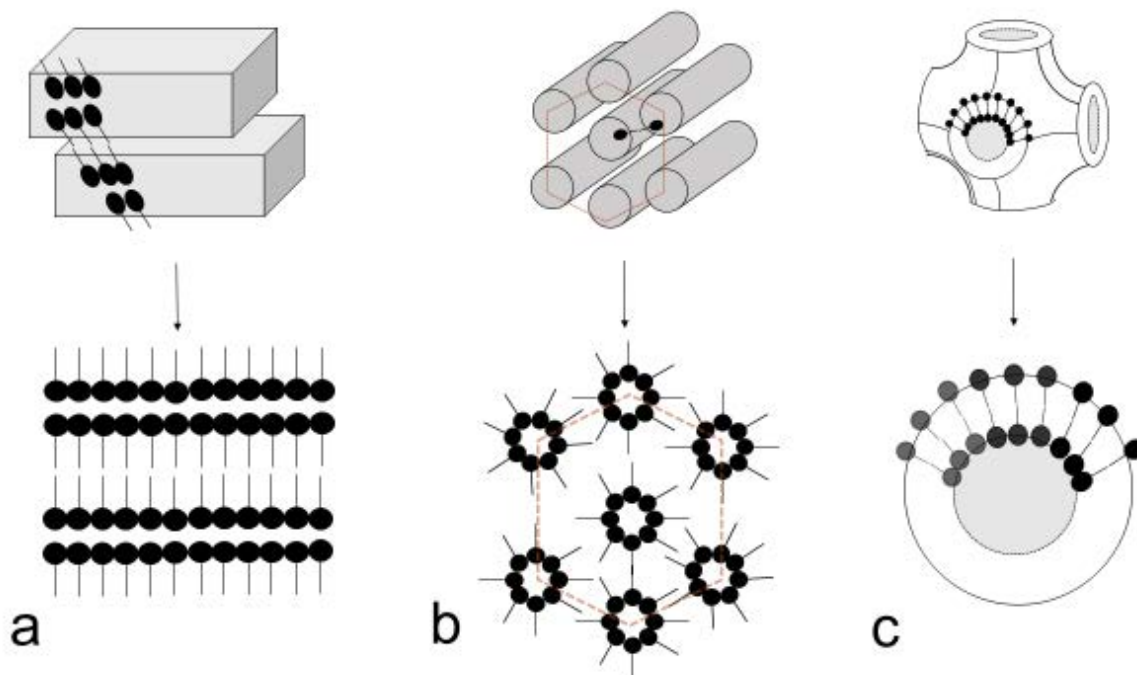
Figura 2. Desenho esquemático do rearranjo molecular de cristais líquidos termotrópicos, sendo: mesofase nemática (A), esmética (B) e colestérica (C).



Adaptado de: DONNIO *et al.* (2007) e PATEL & PATEL (2010).

CLs liotrópicos são formados pela mistura de uma molécula anfifílica e solventes, como óleos e água que, em uma temperatura e concentrações desses dos solventes, podem se organizar em um mesofase. As mesofases formadas podem ser do tipo lamelar, hexagonal ou cúbica (PATEL & PATEL, 2010), conforme mostrado na Figura 3. A fase lamelar consiste de bicamadas de moléculas anfifílicas separadas por água. As estruturas hexagonais consistem em agregados lipídicos cilíndricos num meio contínuo de água. As fases cúbicas consistem em micelas normais ou reversas justamente empacotadas em simetria cúbica ou bicontínua. Dependendo do tipo da fase cúbica formada, a curvatura do filme formado pelo tensoativo varia consideravelmente (MALMSTEN, 2002). A fase cúbica é uma estrutura complexa, cuja interface cadeia carbônica/água pode ter curvaturas positivas e negativas (FLORENCE & ATTWOOD, 2006).

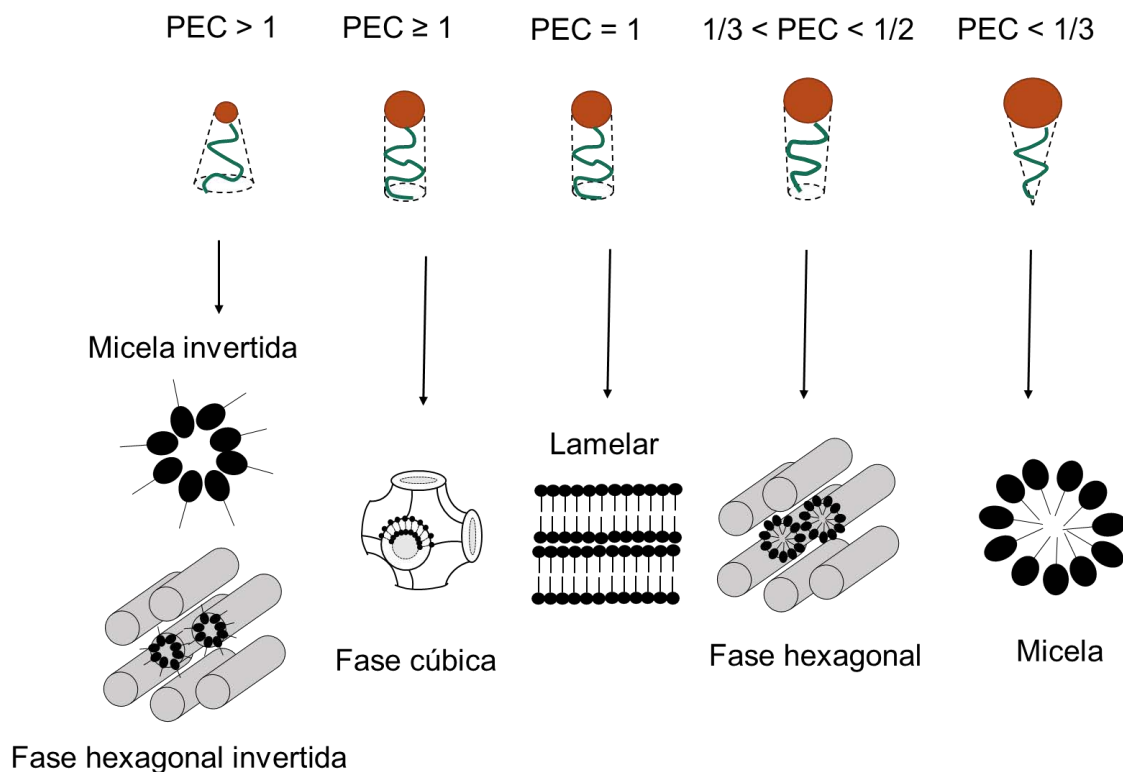
Figura 3. Representações esquemáticas de fases líquidos cristalinas formadas por anfifílicos em água, sendo lamelar (a), hexagonal (b) e cúbica (c).



Adaptado de: ISRAELACHVILI (1991)

A abordagem mais difusa para a racionalização das diferentes estruturas encontradas nos cristais líquidos liotrópicos baseia-se no conceito do parâmetro de empacotamento crítico (PEC) (ISRAELACHVILI, MITCHELL & NINHAM, 1976; ISRAELACHVILI 1991). O PEC é um valor geométrico que consiste na relação entre o volume da cauda hidrofóbica (v), o volume da área de cabeça polar (A) e o comprimento da cauda hidrofóbica (l). Pelas alterações de valores do PEC, pode-se prever aproximadamente a ordem de transição de tensoativos associados com a mudança na curvatura da água ou óleo na interface (MALMSTEN, 2002). A Figura 4 mostra a correspondência entre várias mesofases e sua correspondência com o CEP.

Figura 4. Formação de estruturas líquido-cristalinas baseada no Parâmetro de Empactamento Crítico (PEC) do tensoativo.



Adaptado de: MEZZENGA (2012)

O PEC prevê essencialmente duas classes de morfologias. Quando o valor de PEC for menor que 1 são esperadas morfologias do tipo óleo em água, em que as cabeças polares estão se formando uma interface convexa contra a água. Por outro lado, para PEC maior que 1, a inversão de fase ocorre e observa-se morfologias do tipo água em óleo, em que as superfícies côncavas da cabeça polar estão contra a água. As interfaces planas, o que corresponde à fase lamelar L_α são encontrados para valor de PEC igual a 1. Para a formação de micelas invertidas ou fase hexagonal invertida ou as fases cúbicas invertidas são esperados valores de CEP menor ou igual a 1, as fases hexagonais possuem valores entre 1/3 e 1/2; e micelas quando os valores são menores que 1/3 (MALMSTEN, 2002; SAGALOWICZ *et al.*, 2006).

O PEC tem sido amplamente utilizado para prever e racionalizar as diferenças observadas entre fases líquidas cristalinas e mudanças físicas, como, por exemplo, as alterações que ocorrem no PEC com a temperatura e a composição de tensoativos. O aumento de temperatura leva ao rompimento parcial das ligações de

hidrogênio, reduzindo a quantidade de moléculas de água solvatando as cabeças polares dos tensoativos, levando a um aumento do CEP, porque diminui a área de cabeça polar. Isto pode também explicar a transição de mesofase cúbica para hexagonal, por exemplo (QIU & CAFFREY, 2000).

Com base na literatura publicada, muitos fatores podem influenciar os comportamentos de fase de mesofases cúbicas e hexagonais. A adição de uma terceira substância, como o ácido oleico, trioleína, diglicerol monoleato, fosfatidilcolina de soja, palmitato de retinol, e tetradecano, pode modular as texturas das mesofases e até mesmo resultar na transição de fase (NAKANO *et al.*, 2002; YAGHMUR *et al.*, 2004; YAGHMUR *et al.*, 2006). Foi relatado que o aumento ou a diminuição da temperatura ou pressão, também pode induzir a transição de fase de mesofases (YAGHMUR *et al.*, 2009). Além disso, a concentração de sal e valor do pH tem um efeito sobre o comportamento da transição de fase de CLs (AWAD *et al.*, 2005; OKAMOTO *et al.*, 2008).

O conceito do PEC é limitado a uma interpretação qualitativa dos diagramas de fase e não pode ser usado para trazer uma visão sobre a complexidade estrutural das mesofases, nem sobre os mecanismos supramoleculares que regulam o seu comportamento de organização estrutural (MEZZENGA, 2012).

3.4 Estratégias para liberação de fármacos utilizando a via bucal

A liberação de fármacos para a via bucal tem ganho grande interesse no campo farmacêutico (SMART, 2005b). Esse interesse tem aumentado, pois quando a via bucal é comparada com a administração oral, apresenta vantagens que podem maximizar o potencial terapêutico de fármacos ou moléculas bioativas (PATEL, LIU & BROWN, 2011).

Quando um fármaco é administrado pela via bucal, ele tende não sofrer metabolismo pré-sistêmico, como acontece no trato gastrointestinal, bem como o metabolismo de primeira passagem no fígado após a absorção para a corrente circulatória (PATEL, LIU & BROWN, 2011; PATEL, LIU & BROWN, 2012).

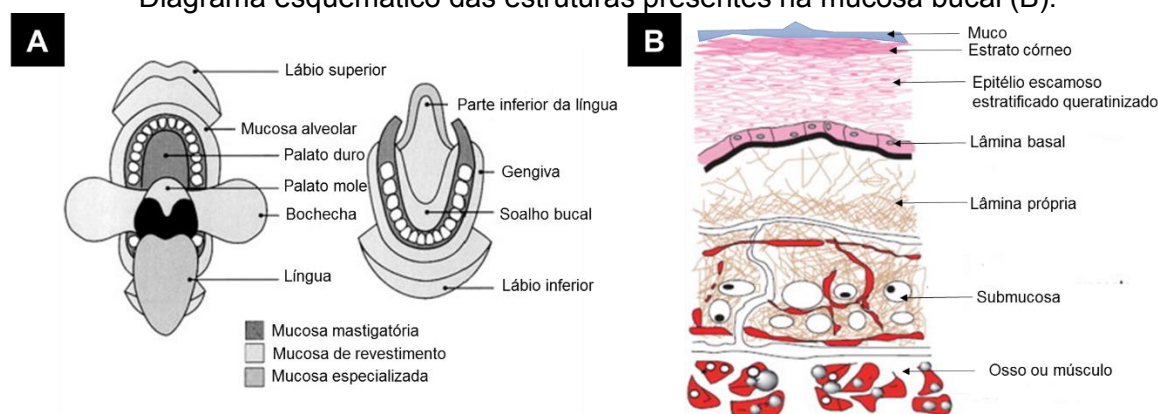
O principal desafio para o sucesso da liberação bucal é o tempo de residência da forma farmacêutica no ambiente bucal. Durante a administração bucal, as formas farmacêuticas precisam manter contato com a membrana mucosa para permitir que

os fármacos possam atuar no local de aplicação, ou serem absorvidos através da mucosa. No entanto, o cisalhamento no ambiente bucal, provocado pelo fluxo de saliva, ingestão de alimentos, movimento da boca para deglutir ou até mesmo pela fala, podem impedir que tais dispositivos sejam aderidos à mucosa bucal, levando a uma redução ou nenhuma eficácia (PATEL, LIU & BROWN, 2012).

A mucosa bucal reveste o interior da bochecha, bem como a área entre as gengivas e os lábios superior e inferior (KRAAN *et al.*, 2014) e tem uma área média de superfície de 100 cm² (SATTAR, SAYED & LANE, 2014). Sua função principal é proteger os tecidos subjacentes de danos mecânicos e químicos e a entrada de xenobióticos (SATTAR, SAYED & LANE, 2014).

A anatomia do sítio bucal consiste em três tipos de mucosa oral: a mucosa de revestimento encontrada no exterior do vestíbulo oral, a região sublingual e a mucosa especializada. A mucosa especializada é encontrada na superfície dorsal da língua, enquanto a mucosa mastigatória é encontrada no palato duro e nas gengivas (SMART, 2004). A mucosa de revestimento compreende cerca de 60%, a mucosa mastigatória aproximadamente 25%, e a mucosa especializada aproximadamente 15% da área total da superfície da mucosa oral em um ser humano adulto (COLLINS & DAWES, 1987). As estruturas anato-morfológicas e histológicas da cavidade bucal estão representadas na Figura 5A e 5B, respectivamente.

Figura 5. Representação esquemática dos diferentes revestimentos da mucosa da boca (A). Diagrama esquemático das estruturas presentes na mucosa bucal (B).



Adaptado de: SQUIER & KREMER (2001) e SMART (2004), respectivamente.

A mucosa mastigatória está localizada nas regiões particularmente sensíveis às tensões resultantes de atividade de mastigação. As células superficiais da

mucosa mastigatória são queratinizadas e uma lâmina própria liga firmemente a mucosa ao periósteo subjacente. A mucosa de revestimento, por outro lado, não é tão sujeita a essas cargas mastigatórias e, conseqüentemente, tem um epitélio não queratinizado, que fica em uma lâmina própria fina e elástica, aderido a uma submucosa. A mucosa presente no dorso da língua é uma mucosa gustativa especializada, que tem superfícies com papilas (COLLINS & DAWES, 1987).

As espessuras das mucosas variam de 500-800 μm para a mucosa bucal e para a mucosa sublingual e gengival, com valores entre 100-200 μm de espessura (GANDHI & ROBINSON, 1994). A natureza do revestimento epitelial varia de acordo com a função do tecido, mas em geral ele funciona como uma barreira para fármacos lipofílicos (GANDHI & ROBINSON, 1994).

A saliva é um fluido aquoso moderadamente viscoso secretado pelas glândulas parótida, submandibular e sublingual (FARNAUD *et al.*, 2010). Uma película salivar (película) é distribuída sobre as superfícies da boca, revestindo as células epiteliais e esmalte dentário (BRADWAY *et al.*, 1989) e a espessura da película salivar é calculada como sendo de apenas 70-100 μm (COLLINS & DAWES, 1987).

Os principais componentes da saliva são muco, proteínas, sais minerais e enzimas. A saliva é considerada um sistema tampão fraco com um pH de 5,5 - 7, sendo que a faixa de pH depende da composição e composição iônica que são afetados pelo tipo e grau de estimulação (olfato, paladar, e tipo de alimento) e hora do dia. A taxa de fluxo salivar normal é de aproximadamente 0,5 mL.min⁻¹, resultando na secreção diária entre 0,5 e 2 L, mas devido a deglutição contínua, o volume constante da saliva na boca é de aproximadamente 1 mL (PATEL, LIU & BROWN, 2011; SATTAR, SAYED & LANE, 2014).

O muco é um material secretado como um componente da saliva pelas glândulas salivares. É composto principalmente glicoproteínas que são chamadas de mucinas, que são macromoléculas com um peso molecular entre 0,5 e 20 MDa (TABAK *et al.*, 1982). SLOMIANY *et al.* (1996) revisaram os aspectos moleculares de mucinas salivares e da natureza das interações da mucosa oral com a mucina. As cargas negativas das mucinas, em valores de pH fisiológicos, resultam na presença de resíduos de ácido siálico e sulfato. Estas cargas negativas permitem que a mucina se ligue à superfície de células epiteliais, formando uma camada

gelatinosa. Um receptor para mucinas salivares também foi identificado e caracterizado na mucosa bucal (SLOMIANY *et al.*, 1993) o que pode contribuir para a adesão na superfície do epitélio bucal.

PADERNI *et al.* (2012) relataram que administração de fármacos através da mucosa bucal pode ser subdividida em duas abordagens diferentes que podem resultar num efeito local ou sistêmico. Essa variabilidade é resultante das diferenças regionais, em termos de características anatômicas e de permeabilidade, de cada sítio anatômico.

As mucosas queratinizadas, presentes na mucosa gengival e palatal duro, não são consideradas ainda um local para a administração sistêmica, sendo considerados como locais úteis para a entrega local de fármacos no tratamento de doenças orais localizadas na gengiva ou no palato (PADERNI *et al.*, 2012).

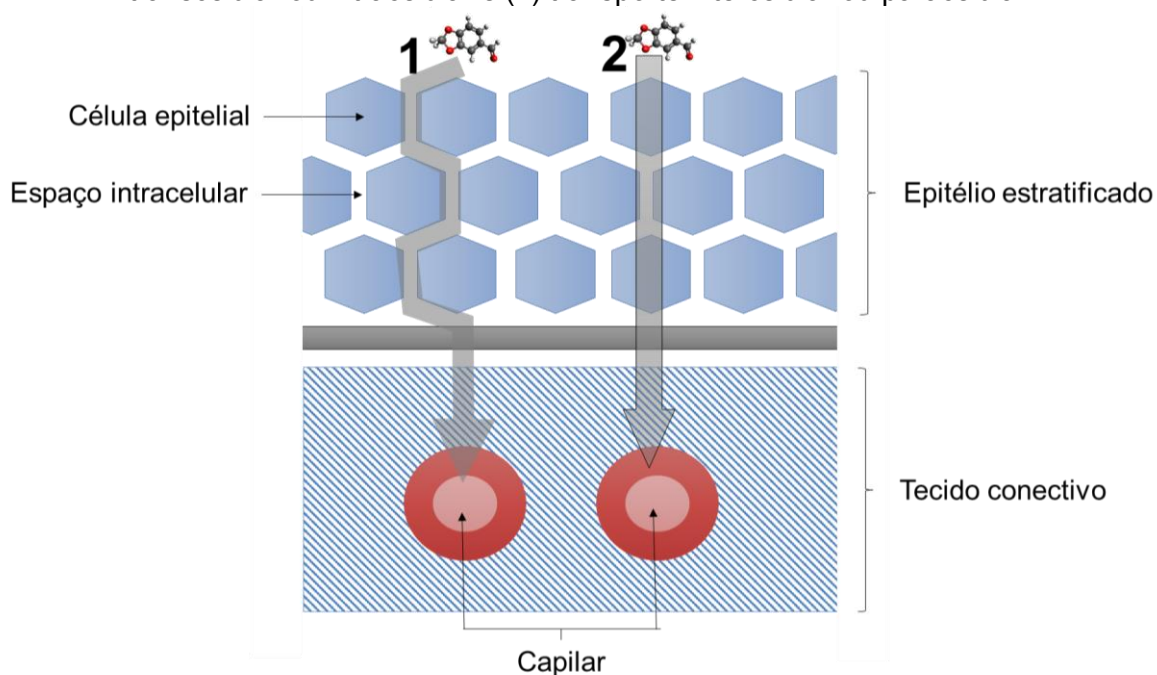
A administração através da mucosa não queratinizada pode ser subdividida em duas abordagens: a liberação pela via sublingual e entrega pela mucosa bucal (PADERNI *et al.*, 2012). A mucosa sublingual é mais permeável, rica em vascularização e mais fina que a mucosa bucal, tornando-se assim um local viável para um rápido início de absorção (MADHAV *et al.*, 2009). Dessa forma, a via sublingual é geralmente usada para a distribuição sistêmica no tratamento de desordens agudas. No entanto, a superfície dessa mucosa é constantemente lavada pela saliva e o cisalhamento exercido pela língua faz com que seja difícil de manter a forma farmacêutica em contato com a mucosa (MADHAV *et al.*, 2009).

A mucosa bucal que reveste as bochechas é menos permeável, sendo incapaz de proporcionar um rápido início de absorção, quando comparada com a mucosa sublingual; porém, pode ter efeitos locais ou sistêmicos quando fármacos são administrados (HARRIS & ROBINSON, 1992; PADERNI *et al.*, 2012). A superfície da mucosa bucal é relativamente imóvel e mais permeável do que os outros tecidos da mucosa oral. Assim, torna-se um local de escolha para a administração de sistemas de liberação controlada que precisam ficar aderidos por um prolongado período (MADHAV *et al.*, 2009).

Os principais fatores que afetam a absorção de fármacos pela via bucal são as propriedades físico-químicas do fármaco, os processos biológicos envolvidos na cavidade bucal e o tipo de dispositivo delineado (REPKA, CHEN & CHAN, 2010).

Os fármacos podem alcançar as estruturas adjacentes locais ou a circulação sistêmica pelas vias transcelulares, paracelulares ou por um mecanismo sinérgico utilizando as duas vias simultaneamente. A permeação do fármaco pelas células epiteliais envolve o transporte através da membrana apical celular, o espaço intracelular e a membrana basolateral como mostrado na Figura 6.

Figura 6. Mecanismos de transporte de moléculas pela via bucal, sendo (1) transporte transcelular ou intracelular e (2) transporte intercelular ou paracelular.



Adaptado de:ŞENEL & HİNCAL (2001)

O transporte de fármacos através da via transcelular, também conhecida como a via intracelular, pode ocorrer por difusão para moléculas com peso molecular baixo ou pelo transporte ativo, também conhecido como difusão facilitada, para compostos polares ou iônicos; ou pela endocitose e transcitose para macromoléculas (GHOSH & PFISTER, 2005).

O transporte de moléculas através da via intracelular é um complexo fenômeno que é dependente de vários parâmetros físico-químico dos fármacos, como, por exemplo, o peso molecular, coeficiente de partição óleo/água, carga iônica e a conformação estrutural. Os compostos lipofílicos e pequenas moléculas hidrofóbicas predominantemente sofrem transporte intracelular, onde a difusão é

inversamente proporcional à quantidade de grânulos de revestimento da membrana presente nos espaços intracelulares da matriz (GANDHI & ROBINSON, 1994).

Uma vez que a membrana da célula é de natureza lipofílica, fármacos hidrofílicos terão dificuldade de permear a membrana celular devido ao seu baixo coeficiente de partição. O transporte passivo de compostos hidrofílicos, incluindo macromoléculas, tais como peptídeos e proteínas, pode ser aumentado pela interação dos excipientes da formulação com a bicamada fosfolipídica e as proteínas integradas da membrana. Solutos solúveis em água, tais como aminoácidos, íons e açúcares, podem ser difundidos através dos poros presentes das membranas das células (GHOSH & PFISTER, 2005).

A permeação de fármaco através das células epiteliais envolve o transporte, dependendo do caráter do fármaco. No caso de fármacos lipofílicos o percurso é realizado pela bicamada lipídica e, para fármacos hidrofílicos, ocorre uma interação associada com as regiões aquosas adjacentes aos grupos polares da cabeça dos fosfolípidios presente nas bicamadas lipídicas (VEUILLEZ *et al.*, 2001).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para o aumento de transporte de fármaco através dos tecidos da cavidade oral, como a utilização de promotores de permeação, como ácidos graxos e tensoativos (GHOSH & PFISTER, 2005; NICOLAZZO, REED & FINNIN, 2005; REPKA, CHEN & CHAN, 2010) e a utilização de polímeros mucoadesivos.

O ácido oleico pode atuar como um permeador tendo um mecanismo proposto de interação com as cadeias carbônicas dos lipídeos da membrana, provocando uma perturbação do empacotamento na região das cabeças polares da bicamada lipídica, resultando num aumento da fluidez dos domínios de fosfolípidios da membrana (TURUNEN *et al.*, 1994; GANEM-QUINTANAR *et al.*, 1998). Estudos visando o aumento da permeabilidade bucal de fármacos com ácido oleico foram reportados por LEE & KELLAWAY (2000), MORISHITA *et al.* (2001), NAKANO *et al.* (2002), BIRUDARAJ *et al.* (2005), LOPES *et al.* (2006), RATHI *et al.* (2011), CAON *et al.* (2014) e SHILEDAR, TAGALPALLEWAR & KOKARE (2014).

O uso de tensoativos mostrou aumentar a permeabilidade de vários compostos através da mucosa bucal, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, segundo SHIN & KIM (2000), NICOLAZZO, REED & FINNIN (2004), MAHALINGAM *et al.* (2007), OH *et al.* (2011) e RAI, TAN & MICHNIAK-KOHN (2011). Os dados

obtidos a partir destes estudos sugerem fortemente que o aumento da permeabilidade é devido a um efeito dos tensoativos sobre os lipídeos intercelulares das mucosas.

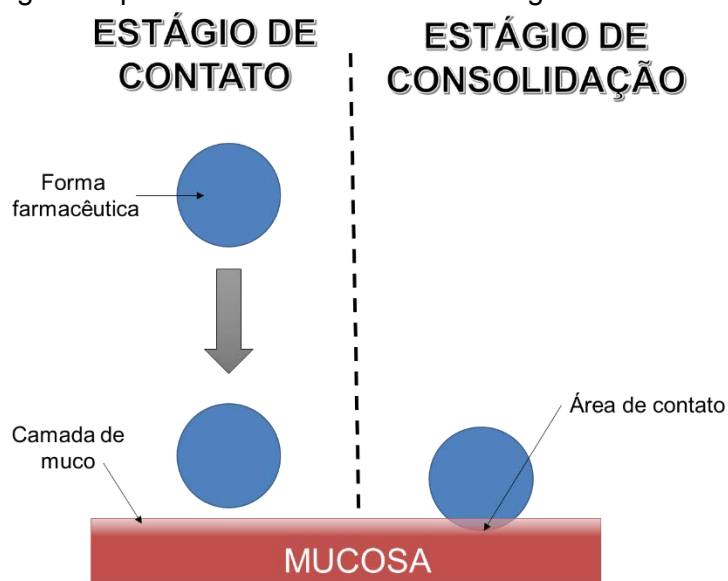
Bioadesão pode ser definido como o estado no qual dois materiais, pelo menos um dos quais é de natureza biológica, são mantidos juntos por um período de tempo prolongado, por meio de forças interfaciais (SMART, 2005a; SMART, 2005b). Sistemas bioadesivos aplicados em mucosas frequentemente são definidos como mucoadesivos, mas o uso desses termos podem ser intercambiáveis (LEUNG & ROBINSON, 1990).

Sistemas mucoadesivos podem ser definidos como aqueles que se ligam as moléculas da camada de muco, mas, na realidade, é difícil discernir se a interação ocorre na superfície celular ou entre as moléculas do material e da camada de muco. Também, para muitos materiais bioadesivos, a interação acontece com as duas estruturas (CARVALHO, CHORILLI & GREMIÃO, 2014).

Durante a década de 1980, este conceito começou a ser aplicado a sistemas de liberação de fármacos. Trata-se da incorporação de moléculas adesivas em algum tipo de formulação farmacêutica destinada a permanecer em contato com o tecido de absorção, liberando o fármaco no local de ação, aumentando sua biodisponibilidade e promovendo efeitos locais ou sistêmicos (BODDUPALLI *et al.*, 2010).

O mecanismo de adesão de determinadas moléculas sobre a superfície de um tecido ou mucosa não é ainda muito bem compreendido. A forma farmacêutica mucoadesiva deve se espalhar sobre o substrato para iniciar um contato com a superfície, promovendo a difusão de suas cadeias dentro do muco. As forças de atração e repulsão surgem, sendo que para que ocorra a mucoadesão, deve haver um predomínio das formas de atração.

Dessa forma, o mecanismo de mucoadesão é geralmente dividido em duas etapas, a etapa de contato e a fase de consolidação, ambas mostradas na Figura 7. A primeira fase é caracterizada pelo contato entre o material e a membrana mucosa, onde correrá o espalhamento e intumescimento da formulação, iniciando um contato mais íntimo com a camada de muco (HÄGERSTRÖM, EDSMAN & STRØMME, 2003)

Figura 7. Dois estágios do processo de mucoadesão: estágio de contato e de consolidação.

Adaptado de: SMART (2005a)

No passo seguinte, na fase de consolidação, mostrado na Figura 7, os materiais mucoadesivos, em virtude da presença pela presença de água, iniciam uma interação molecular com o muco por uma fraca força de van der Waals ou ligações de hidrogênio (SMART, 2005a).

Basicamente, existem duas teorias que explicam o passo de consolidação: a teoria da difusão e da teoria da desidratação. De acordo com a teoria da difusão, as moléculas mucoadesivas e as glicoproteínas do muco interagem mutuamente por meio de interpenetração das suas cadeias e da construção de ligações secundárias (SMART, 2005b).

A teoria da difusão tende a acontecer com o dispositivo mucoadesivo que possui características que favorecem as interações, tanto químicas e mecânicas, com o muco. Moléculas com grupos funcionais que possam interagir por ligações de hidrogênio (OH, -COOH), com carga de superfície aniônica; ou cadeias flexíveis, podem interagir e penetrar na camada de muco (MATHIOWITZ, CHICKERING & LEHR, 1999)

A teoria eletrônica é baseada no pressuposto de que ambos os materiais mucoadesivos e biológicos possuem cargas elétricas opostas. Assim, quando entram em contato, eles transferem elétrons para a construção de uma camada dupla na interface, em que as forças de atração dentro desta camada determinam a

força mucoadesiva. Outra teoria importante é a teoria de adsorção, onde o material adere ao muco por interações químicas secundárias, tais como van der Waals e ligações de hidrogênio, atração eletrostática ou de interações hidrofóbicas (SMART, 2005b).

A mucoadesão pode ser explicada por várias outras teorias; entretanto, esse é um processo complexo em que podem existir dois ou mais mecanismos atuando concomitantemente, levando a um efeito sinérgico do processo de mucoadesão.

Diversos sistemas de liberação de fármacos podem ser aplicados para a via bucal e podem ser explorados em função das propriedades do sítio anatômico, como o pH, temperatura e a saliva presente.

De acordo com MALMSTEN (2002), os sistemas líquidos cristalinos são interessantes para a via bucal, pois podem ocorrer transições de mesofases, aumentando a viscosidade em presença de saliva, gerando sistemas precursores de cristais líquidos. A alta viscosidade dos cristais líquidos, em alguns casos, pode dificultar sua aplicação por meio de algumas vias, pois é difícil a administração de formulações muito rígidas. Por isso, as transições de fases *in situ* de sistemas líquidos para uma mesofase de maior viscosidade são de extrema importância para o delineamento dos cristais líquidos como sistemas de liberação (MALMSTEN, 2002; MALMSTEN, 2007).

Os sistemas farmacêuticos com baixa viscosidade podem ser interessantes para a aplicação local de fármacos anestésicos para a cavidade oral ou de fármacos antimicrobianos no tratamento de doenças periodontais (BRUSCHI *et al.*, 2007; BRUSCHI *et al.*, 2008). A transição de mesofase leva ao aumento da viscosidade da formulação, que pode promover a fixação da formulação num local de ação desejado após sua administração *in situ*. Estas propriedades podem ser uma excelente estratégia para o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos (CARVALHO, 2012).

A teoria da mucoadesão para sistemas líquido-cristalinos pode ser explicada pelo aumento da viscosidade, durante a transição de fase, que leva ao aumento da adesividade do sistema sobre uma superfície de contato (CARVALHO *et al.*, 2013). Esse mesmo mecanismo de mucoadesão pode ser também atribuído aos hidrogéis de poloxâmeros que sofrem um aumento de viscosidade, passando do estado líquido para semissólidos, pela transição de temperatura, acarretando no aumento

da adesividade da formulação no local de aplicação e consequentemente no aumento da retenção da forma farmacêutica (SALAMAT-MILLER, CHITTCHANG & JOHNSTON, 2005; LAFFLEUR, 2014).

Outro mecanismo proposto difere da interação clássica entre substrato e mucina, mas sim entre substrato e água. Este processo de mucoadesão se mostra inversamente proporcional à quantidade de água no sistema formado e sugere que sistemas lamelares possuem propriedades mucoadesivas maiores com relação ao hexagonal (LEE, YOUNG & KELLAWAY, 2001).

A utilização de mesofases líquido-cristalinas tem sido estudada por diversos autores para a liberação bucal de fármacos, vide Quadro 1, resultando em sistemas promissores para a veiculação de fármacos e moléculas bioativas para o tratamento de doenças bucais ou na liberação sistêmica de fármacos.

Quadro 1. Resumo geral de sistemas líquido-cristalinos, sua composição, estrutura formada e fármaco, com aplicabilidade para a via bucal.

Composição	Estrutura	Fármaco	Literatura
Monoleína/água	Lamelar	Peptídeo [D-Ala ² , D-Leu ⁵] encefalina	LEE & KELLAWAY (2002)
Monoleína/água/poloxâmero	Hexagonal	Progesterona	SWARNAKAR <i>et al.</i> (2007)
PPG-5-CETETH-20/miristato de isopropila e água	ND ^a	Micropartículas de gelatina contendo própolis	BRUSCHI <i>et al.</i> (2008)
Monoleína/água	Lamelar Cúbica	Polihexametilenobiguanida	CREMONEZ, BENTLEY & LARA (2013)
Monoleína/água	Lamelar Cúbica	Polihexametilenobiguanida	SOUZA <i>et al.</i> (2014)
Fitantriol/água	Hexagonal	Triancinolona	(DU <i>et al.</i> , 2014)
Ácido oleico/PPG-5-CETETH-20/Água/Poloxâmero 407	Lamelar Hexagonal	Peptídeo KSL-w	BERNEGOSSI (2014)
Ácido oleico/PPG-5-CETETH-20/Água/Quitosana	Lamelar Hexagonal	Peptídeo p1025	CALIXTO (2013)
Ácido oleico/PPG-5-CETETH-20/Água/Policarbofil	Lamelar Hexagonal	Peptídeo p1025	CALIXTO (2013)
Ácido oleico/PPG-5-CETETH-20/Água/Carbopol 974P	Lamelar Hexagonal	Peptídeo p1025	CALIXTO (2013)
Ácido oleico/PPG-5-CETETH 20/Água/Hidroxietilcelulose	Lamelar Hexagonal	Peptídeo p1025	CALIXTO (2013)
Ácido oleico/PPG-5-CETETH-20/Água/Quitosana e polietilenoimina	Hexagonal	ND ^a	VICTORELLI, CALIXTO & CHORILLI (2014)

^a Não disponível na literatura consultada

Uma estratégia utilizada para aumentar a mucoadesão é a adição de polímeros catiônicos, como a quitosana, que possuem carga e podem interagir com as glicoproteínas de mucina através da camada de difusão eletrônica (SOGIAS, WILLIAMS & KHUTORYANSKIY, 2008). Além disso, a utilização de quitosana em sistemas de liberação para a via bucal se torna interessante, já que foi demonstrado que este polímero promove a absorção de fármacos de alto peso molecular pela transmucosa oral (SANDRI *et al.*, 2004; MORISHITA & PARK, 2010). O mecanismo para a via bucal ainda não é bem compreendido, porém se postula que a quitosana atua por aumentar espaços, formando poros, nas junções celulares no ambiente bucal (ŞENEL & HİNCAL, 2001; SANDRI *et al.*, 2004; SMART, 2011) promovendo a liberação do fármaco pelo mecanismo transcelular.

A utilização de quitosana em veículos para liberação de fármacos para células tumorais se torna interessante, pois as células tumorais expressam um fosfolípido aniônico, chamado fosfatidilserina, que podem interagir com a carga positiva na quitosana, exercendo um papel importante no *up-take* celular (YU *et al.*, 2012). Assim, os grupos NH^{3+} presentes na cadeia da quitosana podem interagir com os grupos negativos na membrana da célula, aumentando assim a ligação do sistema com a membrana e levando a uma interação sistema-célula (LIU *et al.*, 2004). Portanto, essa teoria fundamenta o uso da quitosana em sistemas de liberação como uma forma de promover uma vetorização específica sobre células tumorais e aumentando a resposta frente à exposição de fármacos antitumorais.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado sistemas compostos pelo tensoativo PPG-5-CETETH-20 contendo polímeros mucoadesivos. CALIXTO (2013) e BERNEGOSSI (2014) relatam que o uso de polímeros mucoadesivos em sistemas líquidos-cristalinos para a via bucal pode ser interessante, uma vez que existe o aumento das propriedades mucoadesivas dos sistemas estudados por PPG-5-CETETH-20.

Tendo em vista as vantagens que os tensoativos podem oferecer no desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos e os resultados promissores obtidos por nosso grupo de pesquisa em relação ao tensoativo PPG-5-CETETH-20, este trabalho tem como objetivo explorar estas plataformas tecnológicas para o desenvolvimento de um sistema de liberação nanoestruturado mucoadesivo para a administração bucal de curcumina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

- Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, lote E42E52)
- Ácido acético (Qhemis, lote 36912);
- Ácido oleico (Synth, lote 149659);
- Álcool Cetílico Etoxilado (20EO) e Propoxilado (5PO), PPG-5-CETETH-20 (Volp, lote 0000742419);
- Álcool etílico 99,5% (Quemis, lote Q0074);
- Curcumina, grau de pureza de 77% (Sigma-Aldrich, lote SLBD0850V);
- Metanol, grau HPLC (J.T. Baker, lote E42E53)
- Poloxamer® 407, Poloxâmero (Sigma-Aldrich, lote BCBK5005V);
- Quitosana, baixo peso molecular (Sigma-Aldrich, lote MKBG3334V);

4.1.2 Equipamentos

- Analisador de textura TA-XTplus, Stable Micro System® (Surrey, Inglaterra)
- Câmera digital Samsung DV300F (Samsung, Coréia do Sul)
- Centrífuga de tubos Sorvall TC6 (Sorvall, EUA);
- Cromatógrafo Líquido Varian, composto por módulo de bombeamento de solvente ProStar/Dynamax 210/215, detector UV ProStar 330 UV-VIS PDA, injetor automático Varian Autosampler, forno de coluna, Coluna de fase reversa C18 Luna 250 mm x 4.6mm 5µm (Phenomenex, EUA) e pré-coluna RP18 3 cm x 4 cm (Phenomenex, EUA);
- Dispositivo Microette Plus contendo células de Franz com capacidade nominal de 7 mL acoplado a banho termostatizado para aquecimento de água, equipamento controlador de agitação da placa magnética e coletor automático (Hansen Research, Reino Unido);
- Espectrofotômetro UV Carry 60 (Agilent Technologies, EUA);

- Homogeneizador de tubos, modelo AP22, Phoenix (local não especificado);
- Medidor de potencial zeta e tamanho hidrodinâmico Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, EUA);
- Microscópio de luz polarizada Carl-Zeiss Axion 40 (Carl-Zeiss, Alemanha);
- Texturômetro TAXTplus (Stable Micro System, Reino Unido);
- Ultraturrax Digital T25 (Ika, Alemanha)

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das dispersões

4.2.1.1 Preparo da dispersão de quitosana

A dispersão de quitosana foi preparada na concentração de 5% (m/m). A quitosana foi dispersada em solução de ácido acético 5% (m/v) e mantida por agitação mecânica a 150 rpm por 24 horas.

4.2.1.2 Preparo da dispersão de poloxâmero

A dispersão de poloxâmero foi preparada na concentração de 5% (m/m). O poloxâmero foi dispersado em água purificada gelada e mantido em geladeira por 24 horas para completa dispersão.

4.2.1.3 Preparo da dispersão de poloxâmero e quitosana

A dispersão de poloxâmero foi preparada na concentração de 5% (m/m). O poloxâmro foi dispersado em ácido acético 5% gelado e mantido em geladeira por 24 horas. Após este período, a dispersão de quitosana foi adicionada, na concentração de 5% (m/m) e mantida por agitação mecânica a 150 rpm por 24 horas, em temperatura ambiente.

4.2.2 Construção dos diagramas de fase ternários

Quatro diferentes diagramas de fases ternários foram construídos, fixando-se, em todos, ácido oleico como fase oleosa e PPG-5-CETETH-20 como tensoativo. Foram utilizados diferentes componentes como fases aquosas, dentre os quais: a

água, dispersão de quitosana 0,5%, dispersão de poloxâmero 0,5% e dispersão de quitosana e poloxâmero 0,5%.

Em temperatura ambiente, foram misturados, com agitação em vórtex, diferentes proporções, de 0 a 100% (m/m), de cada fase dos sistemas, resultando, desse modo, na construção do diagrama de fase ternário com 54 pontos.

Para os sistemas ternários com dispersão polimérica como fase aquosa, inicialmente, foram transferidos 10% da dispersão polimérica na concentração 5% resultante da proporção total de fase aquosa, e foram completados com água purificada, de modo que resultasse numa porcentagem polimérica final nos sistemas de 0,5% (m/m).

Os sistemas foram deixados em repouso por 48 horas até o completo equilíbrio de fases e eliminação de bolhas. Após esse período, os sistemas foram classificados visualmente como sistema transparente líquido (STL), sistema translúcido de alta viscosidade (STAV), sistema translúcido de baixa viscosidade (STBV), emulsão viscosa (EMV), emulsão líquida (EML) e separação de fases (SF).

Os diagramas de fases foram plotados através do programa SigmaPlot®, versão 11.0 (Systat Software, EUA).

4.2.3 Seleção das formulações a partir do diagrama ternário

Para realização da caracterização físico-química, foram selecionados 12 pontos, sendo três deles de cada um dos diagramas, os quais estão listados no Quadro 2. Em todos os sistemas, a porcentagem de tensoativo foi fixada em 40% e variou-se a razão água/óleo.

Quadro 2. Composição (%) dos sistemas selecionados para a caracterização físico-química.

Formulação	Concentração (%)				
	FA	AO	PPG5CETETH20	QS	PO
F1	30	30	40	-	-
F2	40	20	40	-	-
F3	50	10	40	-	-
F1P	30	30	40	-	0,5
F2P	40	20	40	-	0,5
F3P	50	10	40	-	0,5
F1Q	30	30	40	0,5	-
F2Q	40	20	40	0,5	-
F3Q	50	10	40	0,5	-
F1QP	30	30	40	0,5	0,5
F2QP	40	20	40	0,5	0,5
F3QP	50	10	40	0,5	0,5

Nota: P - Poloxâmero na fase aquosa; Q – Quitosana na fase aquosa; QP – Quitosana e poloxâmero na fase aquosa; QS – Quitosana; PO - Poloxâmero

4.2.3.1 Microscopia de luz polarizada

Os sistemas obtidos foram classificados quanto à capacidade de desviar a luz polarizada. Foi depositada sobre uma lâmina uma pequena quantidade de amostra e coberta com lamínula. As imagens foram obtidas em microscópio de luz polarizada.

4.2.3.2 Espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS)

O arranjo estrutural dos sistemas foi analisado por SAXS. Os dados foram coletados na estação de medidas D11-A SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas - SP, em monocromador do tipo Si (111) comprimento de onda de 1,608 Å. As amostras foram colocadas em uma cela à temperatura ambiente. O espalhamento parasita, espalhamento de partículas existentes no sistema sem amostra foi subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras foram medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais.

A posição do primeiro pico das curvas de SAXS, q_1 , é usada para avaliar os parâmetros de estrutura das fases lamelar e hexagonal, sendo a distância entre planos (d) e aresta de hexágono (a), a partir das equações 1 e 2, respectivamente:

$$d = \frac{2\pi}{q_1} \quad (1)$$

$$d = \frac{2\pi}{q_1} = \frac{\sqrt{3}}{2} a \quad (2)$$

4.2.3.3 Análise por reologia oscilatória

A análise oscilatória foi realizada empregando reômetro RS-1 (Haake) utilizando geometria cone/placa (C35/2° Ti) e placa/placa de 35 mm, de acordo com a consistência de cada formulação, à temperatura de 37 °C, em triplicata.

Primeiramente, foi realizado o teste de varredura de tensão para determinação da região viscoelástica. Para esse teste foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 Hz.

Após a determinação da tensão de 0,5 Pa da região viscoelástica, colocou-se o reômetro no modo teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 10 Hz, à tensão de 0,5 Pa.

Foi realizada uma análise quantitativa da dependência de G' pela frequência, onde foi determinado o valor de r a partir regressão linear dos dados obtidos a partir do espectro mecânico. Além disso, foi calculado o expoente n através da equação da Lei da Potência, equação 3, conforme metodologia de SAXENA, KALOTI & BOHIDAR (2011), o qual indica a estrutura dos sistemas obtidos.

$$G' = S\omega^n \quad (3)$$

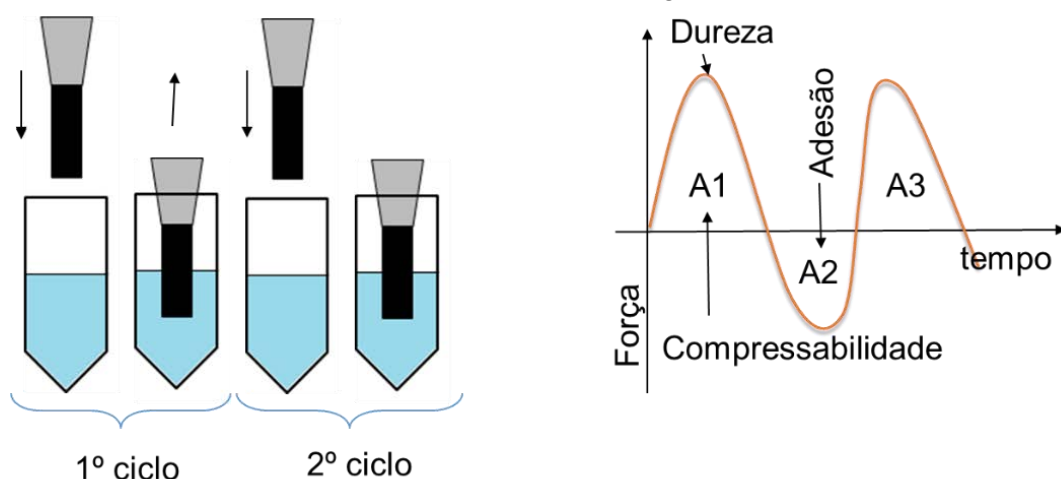
onde: G' é o módulo de armazenamento, ω é a frequência oscilatória e S é a resistência do gel, sendo n o expoente viscoelástico.

4.2.3.4 Análise do perfil de textura

A análise de perfil de textura foi realizada em analisador de textura, no qual é possível avaliar as propriedades mecânicas, tais como, dureza, compressibilidade, adesividade e coesão. O desenho esquemático da técnica se encontra na Figura 8.

- Dureza: é o pico de força máxima obtido durante o primeiro ciclo de compressão;
- Compressibilidade: é o trabalho total requerido para deformar a amostra durante o primeiro ciclo de compressão da prova analítica;
- Adesividade: representa o trabalho requerido para vencer as forças atrativas entre a prova analítica e a amostra sendo analisada;
- Coesão: é a razão entre a área positiva obtida durante a segunda compressão (A3) e a obtida durante a primeira compressão; Ela mede a taxa que um material se rompe sob uma ação mecânica.

Figura 8. Representação ilustrativa do texturômetro e as adaptações realizadas para o teste TPA. A1: resistência à compressão; A2: adesão; A3: segundo ciclo de compressão.



Para realização do teste, 7 gramas das formulações foram pesadas em tubos de centrífugas cônicos de 50 mL e centrifugados a 4000 rpm, por 3 minutos, para eliminação de bolhas e tornar sua superfície lisas. Os sistemas foram deixados em repouso por 6 horas para ocorrer o equilíbrio de fases.

Os tubos foram colocados abaixo da sonda analítica ($\varnothing$ 10 mm) do analisador de textura, que foi programado para comprimir a amostra numa velocidade de $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$ até a profundidade pré-definida de 10 mm e retornar a superfície na mesma velocidade. Após o tempo de 5 s, uma segunda compressão iniciou-se nas mesmas condições. Todas as análises foram realizadas em seis replicatas, à temperatura de 37°C .

4.2.3.5 Análise das propriedades mucoadesivas

A análise da força mucoadesiva foi realizada conforme a execução dos itens 4.2.3.1 ao item 4.2.3.5.

4.2.3.6 Preparação da coleta da saliva humana

A saliva não estimulada foi obtida de 6 doadores adultos e saudáveis, de ambos os sexos, e que não fizeram uso de antibióticos, soluções para bochecho ou qualquer outro medicamento conhecido por afetar a composição e fluxo salivar, nos últimos três meses. A saliva foi coletada em tubos de centrifuga cônicos de 50 mL resfriados por gelo e, posteriormente, uma quantidade igual de saliva de cada doador foi misturada, homogeneizada e submetida à centrifugação 10.000 g por 5 minutos a 4 °C sendo, em seguida, filtrada por meio de sistema de filtração com membrana de 0,22 µm. A saliva não utilizada imediatamente foi armazenada a -70 °C. Esta etapa do projeto teve parecer (nº 423.907) favorável pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

4.2.3.7 Obtenção da mucosa esofágica de porco

A mucosa esofágica de porco foi obtida em um matadouro local, situado de cidade de Tupã (SP) e foi armazenada em banho de gelo, a 4 °C, até o seu processamento que ocorreu em, no máximo, 6 horas. As amostras foram cortadas e seccionadas, de acordo com as regiões de interesse, e foram embaladas em filme plástico e posteriormente em papel alumínio e mantidas em congelador por um período de, no máximo, 2 meses. Quando utilizadas para o teste, as amostras teciduais foram descongeladas e mantidas em banho com tampão salina (NaCl 0,9%).

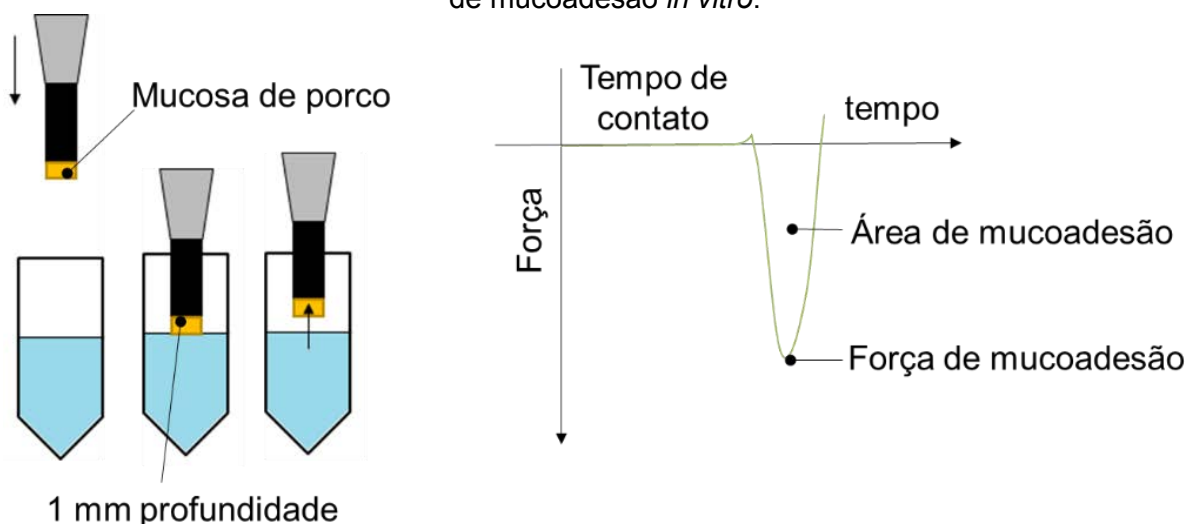
4.2.3.8 Avaliação *in vitro* da força de mucoadesão

A força necessária para remover os sistemas selecionados da superfície da mucosa suína foi avaliada *in vitro*, utilizando o analisador de textura.

A mucosa suína foi fixada com elástico à extremidade inferior da sonda cilíndrica (10 mm de diâmetro) do equipamento. Antes do ensaio, a mucosa foi imersa em saliva humana para simular o ambiente bucal. Na temperatura de 37 °C, 7 gramas das formulações foram acondicionadas em tubos cônicos de centrifuga de 50 mL. Estes tubos foram centrifugados a 4000 rpm, por 3 minutos, para eliminação

de bolhas, de forma a tornar sua superfície lisa. O desenho esquemático da técnica está sendo relatado na Figura 9.

Figura 9. Representação ilustrativa do texturômetro e as adaptações realizadas para o teste de mucoadesão *in vitro*.



O teste foi iniciado abaixando a sonda analítica à uma velocidade constante (1 mm.s^{-1}) até que a mucosa entrasse em contato com a amostra. A mucosa penetrou 1 mm a amostra e foram mantidos em contato durante 60 segundos, onde nenhuma força foi aplicada durante este tempo. Em seguida, a sonda subiu a velocidade constante ($0,5 \text{ mm.s}^{-1}$) até ocorrer o destacamento da mucosa esofágica com a formulação.

A força necessária para destacar a mucosa da amostra foi calculada pela curva força *versus* tempo. O teste foi realizado em seis replicatas.

4.2.3.9 Avaliação do potencial zeta em função do tempo após o preparo das formulações

O potencial zeta das formulações foi calculado usando medidas de mobilidade eletroforética realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). Para a realização das medidas, $100 \mu\text{L}$ da formulação foram diluídos com $990 \mu\text{L}$ de água ultrapura e agitados em vórtex de tubos por 2 minutos. A dispersão resultante foi adicionada em coluna de medida de potencial zeta e inserida no equipamento. As análises foram realizadas em triplicatas no tempo zero, 5, 10, 15 e 30 dias.

4.2.4 Estudo do potencial precursor de fases dos cristais líquidos em contato com saliva artificial

Para simular a mudança de fases dos sistemas precursores na cavidade oral, os sistemas foram misturados com saliva artificial, sua composição é apresentada no quadro 3.

Quadro 3. Composição da saliva artificial.

Componente	Quantidade
Fosfato de sódio dibásico anido	0,8020 g
Fosfato de sódio monobásico anido	0,3626 g
Sorbitol 70%	42,700 g
Cloreto de potássio	0,6250 g
Cloreto de sódio	0,8650 g
Cloreto de magnésio hexahidratado	0,1250 g
Cloreto de cálcio dihidratado	0,0720 g
Metilparabeno	1,8 g
Propilenoglicol	10,0 mL
Água purificada q.s.p.	1000 mL

Fonte: NAKAMOTO (1979)

Os sistemas foram pesados e diluídos em proporções de saliva artificial para simular as transições de fases decorrentes na cavidade oral. O fármaco foi adicionado às formulações numa concentração de 0,5% (m/m).

4.2.4.1 Caracterização físico-química, reológica, de textura e das propriedades mucoadesivas

Os sistemas gerados foram caracterizados pelas metodologias descritas do item 4.2.4 ao item 4.2.8.

4.2.5 Desenvolvimento do método analítico por CLAE para quantificar a curcumina

A validação de um método analítico é definida como o processo pelo qual é estabelecido para sua finalidade pretendida e que as características de eficiência do método correspondem aos requerimentos mínimos necessários para a aplicação analítica do método (PÉREZ-LOZANO *et al.*, 2004). Os parâmetros linearidade,

precisão, exatidão, robustez, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram avaliados segundo Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005) e pela RE 899/2003 (BRASIL, 2003). O método de quantificação para a curcumina por CLAE foi adaptado de (WICHITNITHAD *et al.*, 2009) para extratos vegetais de *C. longa*.

O volume de amostra injetado foi de 20 μL , a proporção de fase móvel (água acidificada contendo 2% de ácido acético:acetonitrila) foi de 50:50, fluxo de fase móvel de 1,2 mL por minuto, comprimento de detecção no UV de 425 nm e temperatura do forno de 33 °C.

4.2.5.1 Seletividade

Para determinar este parâmetro foram comparados os cromatogramas obtidos para solução metanólica, tampão fosfato pH = 7,4 com LSS, e com a solução de extração da mucosa sem curcumina.

4.2.5.2 Linearidade

A linearidade foi estabelecida pelas médias de três curvas padrão autênticas, as quais foram obtidas em oito níveis de concentrações diferentes de curcumina, variando de 0,5 – 75,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cada concentração foi determinada em triplicata para cada curva padrão e a linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados. Para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do modelo, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste unilateral, $p < 0,05$.

4.2.5.3 Precisão

Para o estudo de precisão foram utilizadas concentrações de 1, 50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da curcumina determinada em triplicata. As análises foram realizadas em dois dias diferentes, não consecutivos. As médias dos resultados obtidos foram avaliadas pelo teste t de *Student* (teste bilateral, $p < 0,05$).

4.2.5.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação do analito para as concentrações 1, 50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em triplicata em metanol. Para as matrizes: tampão fosfato contendo LSS 0,5% e extrato de mucosa foi realizada a

contaminação com curcuma resultando nas concentrações de 1, 50 e 70 µg.mL⁻¹. O coeficiente de variação e a porcentagem de recuperação foram utilizados para avaliar a exatidão, conforme equação 7.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad 7)$$

4.2.5.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados, matematicamente, a partir da curva analítica resultante da média das três curvas analíticas. O cálculo para determinar os valores correspondentes ao LD e LQ, baseia-se no desvio padrão (DP) do residual da linha de regressão e sua relação com a inclinação da reta (IC) ou coeficiente angular na curva analítica, segundo as equações 6 e 7, respectivamente.

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 3,3 \quad 6)$$

$$LQ = \frac{DP}{IC} \times 10,0 \quad 7)$$

4.2.6 Ensaios de avaliação da performance dos SPCL

4.2.6.1 Ensaios de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados em células de Franz. Estas células possuem uma área de difusão de 1,77 cm² e um volume nominal do compartimento receptor de aproximadamente 7,0 mL. Foram utilizadas membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm e que foram hidratadas por 30 minutos no meio receptor. Cerca de 600 mg de amostras foram pesadas e acondicionadas no compartimento doador acima das membranas artificiais. A fase receptora consistiu de tampão fosfato (pH = 7,4) contendo lauril sulfato de sódio (0,5%). O ensaio foi mantido em agitação de 300 rpm e a temperatura utilizada foi de 32 ± 1 °C. Durante o ensaio, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL em tempos pré-determinados (0,5, 1, 2, 4, 8 e 12 horas). As alíquotas foram filtradas em filtros de seringa PTFE de 0,45 µm e então injetadas em CLAE. Se necessário, os filtrados

foram diluídos com meio receptor para que a concentração fosse mantida dentro da linearidade.

Foi plotado um gráfico de concentração liberada (%) *versus* tempo e os dados foram tratados pelos modelos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi, conforme equações 8, 9 e 10, respectivamente.

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (8)$$

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2,303} \quad (9)$$

$$Q_t = Q_0 + K_H t^{1/2} \quad (10)$$

onde: Q_t é quantidade de fármaco dissolvida no tempo t ; Q_0 é quantidade de fármaco dissolvida no meio; t é o tempo; K_0 é a constante de liberação de ordem zero; k_1 é a constante de liberação de primeira ordem; K_H é a constante de dissolução de Higuchi.

Como controle, foi verificada a liberação de uma solução de 0,5% de curcumina em ácido oleico. As análises foram realizadas em sextuplicatas.

4.2.6.2 Ensaios de permeação *ex vivo*

No estudo, foram empregadas mucosas esofágicas de suínos, que foram mantidas em tampão salina 0,9% por 30 minutos antes do início dos experimentos. A solução tampão fosfato (pH 7,4) contendo LSS 0,5% foi colocada no compartimento receptor. Sobre a extremidade das células foram esticadas as membranas. Foi espalhado uniformemente sobre a membrana cerca de 600 mg de cada formulação contendo curcumina. na concentração de 0,5%, e como controle positivo foi utilizada uma solução de curcumina (0,5%) em ácido oleico.

O ensaio foi mantido em agitação de 300 rpm e a temperatura utilizada foi de 32 ± 1 °C. Durante o ensaio, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL em tempos pré-determinados (0,5, 1, 2, 4, 8 e 12 horas). As alíquotas foram filtradas em filtros de seringa PTFE de 0,45 μ m e injetadas em CLAE para que pudesse ser construído um gráfico de concentração permeada *versus* tempo.

4.2.6.3 Ensaios de retenção em mucosa suína

A extração do curcumina retida na mucosa esofágica de porco foi realizada de acordo com método adaptado de MAZZARINO *et al.* (2015). Decorridas 12 horas de

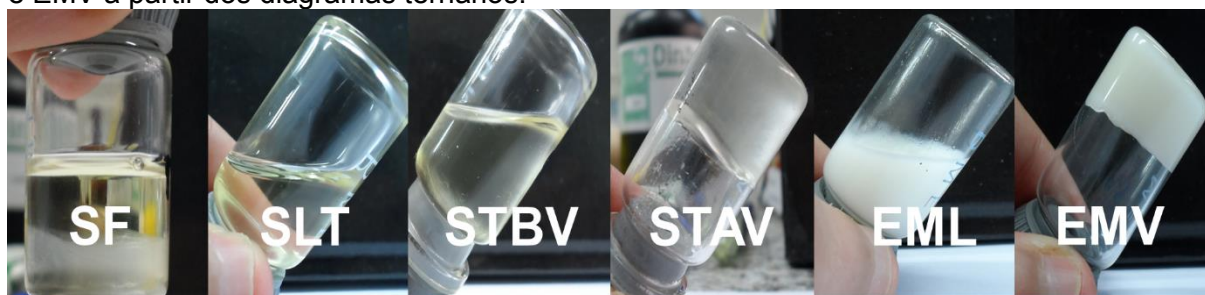
permeação *ex vivo*, a mucosa suína foi retirada do aparelho de difusão. A área da pele exposta à permeação foi limpa com algodão embebido em metanol, recortada e picotada. Os fragmentos obtidos foram triturados com 4 mL de metanol, em homogeneizador de tecidos, velocidade de 10 000 rpm por 2 minutos, até a total dilaceração da mucosa. A suspensão resultante foi submetida à sonicação em ultrassom, por 50 minutos, para o rompimento das células. A solução obtida foi filtrada para um balão volumétrico de 5 mL e o volume completado com solução de metanol. A solução foi filtrada em filtros de seringa PTFE de 0,45 µm e injetada em CLAE. As extrações foram realizadas da mucosa de cada célula contida no permeador (n=6).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção dos diagramas ternários

Os sistemas foram classificados de forma visual da seguinte forma: SF são sistemas que segregam os componentes, formando duas ou três fases, ou formam precipitados devido à insolubilidade do polímero; SLT são sistemas líquidos, que tendem a fluir e viscosidade semelhante à da água; STBV tendem a ser translúcidos e possuem viscosidade relativamente baixa, possuem fluidez ao serem invertidos nos frascos; já os STAV não são fluídos e tendem a se manter compactado nos frascos mesmo após a inversão; sistemas opacos e leitosos foram caracterizados como EML e EMV; entretanto, possuem fluidez assim que são invertidos nos frascos e não são fluídos e tem a se manter compactado nos frascos mesmo após a inversão, respectivamente. As classificações visuais estão dispostas na Figura 10.

Figura 10. Aspecto visual das formulações classificadas como SF, STL, STBV, STAB, EML e EMV a partir dos diagramas ternários.



Os diagramas ternários de fases com ácido oleico, PPG-5-CETETH-20 e água contendo ou não as dispersões poliméricas estão representadas na Figura 11. O diagrama contendo água como fase aquosa mostrou regiões translúcidas e líquidas, que foram classificadas como SLT, indicativo de formação de microemulsões, já que possuem alta carga de tensoativos. Estes dados de formação de regiões microemulsionadas foram observados por CARVALHO (2012) e por CALIXTO (2013) para sistemas constituídos por PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água. No diagrama A, a região contendo 40% de PPG-5-CETETH-20 mostra-se candidata para SPCL, pois com o aumento de água no sistema há transição de STBV para STAV.

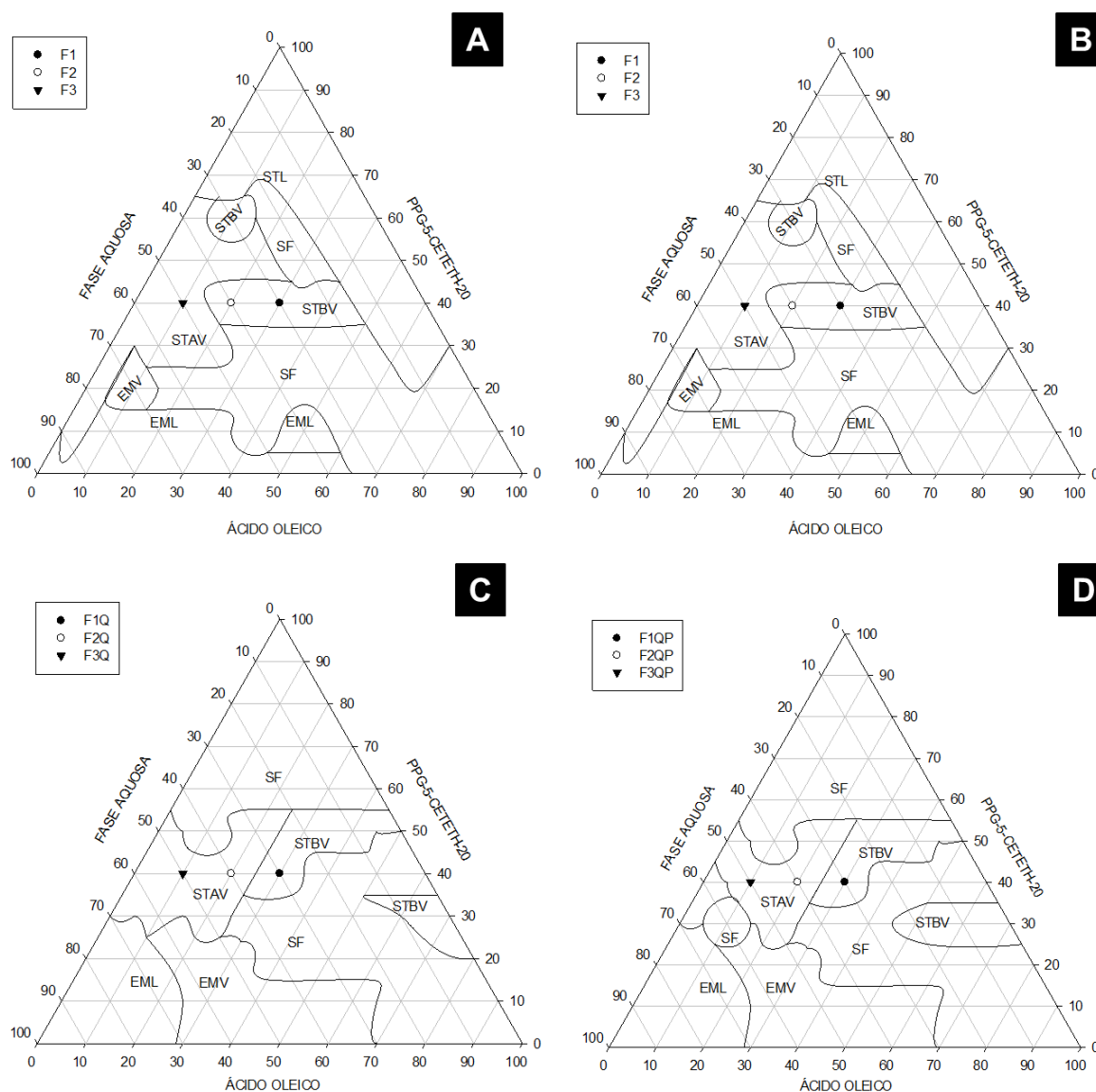
Quando os diagramas foram construídos com as dispersões pode-se observar uma região de SF no vértice inferior, como também formação de sistema emulsivos.

Esses achados foram observados em todos os diagramas estudados. Para o diagrama B, pode-se observar uma ampla área, situada no vértice superior, de formação de STL com alta concentração de tensoativos e baixas concentrações de água.

Para os diagramas ternários de fases contendo quitosana (C e D), observa-se no vértice superior uma região de separação de fases. Esse fenômeno pode ser explicado pela baixa concentração de água nos sistemas, chegando até os 40%, que podem não dispersar adequadamente a quitosana, gerando regiões de SF. CARVALHO (2012) relatou que a incorporação de polímeros, como a quitosana, pode ser dificultada em sistemas contendo PPG-5-CETETH-20, água e ácido oleico, sendo composto por até 40% de fase aquosa. Entretanto, concentrações menores, em torno de 0,1%, podem ser incorporadas sem dificuldade e sem prejuízo na formação de sistema.

Todos os diagramas apresentaram regiões de transição de fase, obtendo regiões de baixa viscosidade para alta viscosidade, na região de 40% de PPG-5-CETETH-20. MALMSTEN (2002) relatou que os sistemas formados por cristais líquidos são interessantes para a via bucal, já que sistemas de baixa viscosidade podem ser administrados facilmente através de uma seringa, e conseqüentemente transitam de mesofase, alterando sua viscosidade, que podem permanecer residentes em uma região da cavidade oral.

Figura 11. Diagrama de fases ternário obtido com a combinação de PPG-5-CETETH-20, ácido oleico e água (a), contendo poloxâmero (b), quitosana (c) e quitosana e poloxâmero (d).



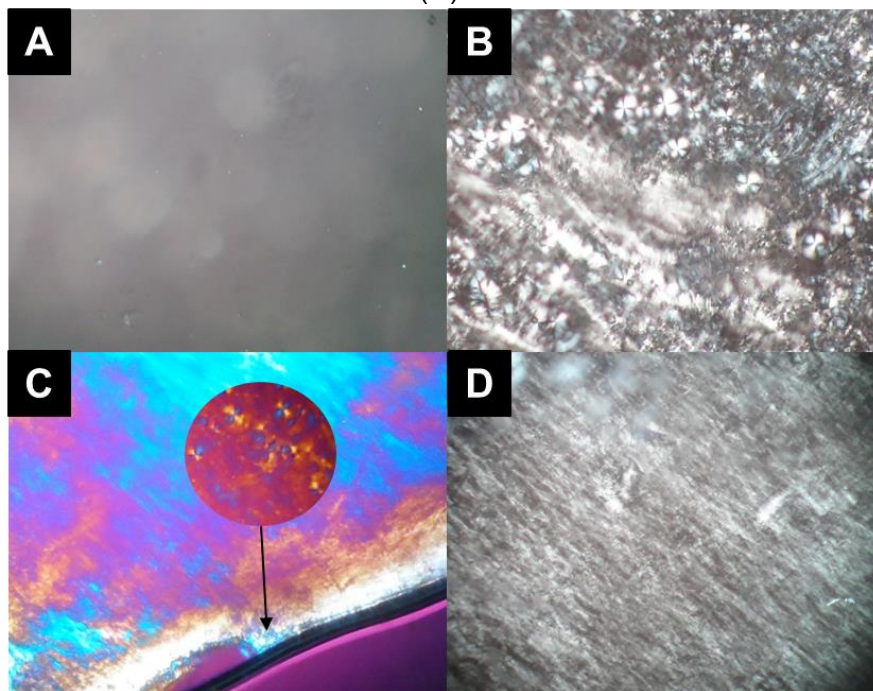
A MLP é uma técnica possível de classificar os sistemas quanto à isotropia e anisotropia. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar. Cristais líquidos liotrópicos lamelares e hexagonais são anisotrópicos e sua organização estrutural resulta em campos de visualização característicos, como as cruzes de Malta no caso da fase lamelar ou estrias no caso da fase hexagonal. Já a fase cúbica, ou mesmo sistemas micelares, microemulsões e emulsões, são isotrópicos e apenas um campo escuro é observado (HYDE, 2002; MALMSTEN, 2007; PATEL & PATEL, 2010).

A Figura 12 mostra as imagens obtidas por MLP das regiões dos sistemas. Os sistemas classificados como EMV ou EML, em todos os diagramas ternários, mostraram campo escuro, (Figura 10A) já que emulsões tendem a não polarizar a luz (MALMSTEN, 2002).

Sistemas classificados como STL foram obtidos para os diagramas contendo ácido oleico, PPG-5-CETETH-20 e água e também aqueles contendo poloxâmero mostraram-se isotrópicos. Entretanto, com o aumento de água, ocorre a formação de cruz de Malta, indicando uma estruturação do sistema em mesofase lamelar. Sistemas anisotrópicos não são capazes de desviar o plano da luz, exibindo um campo escuro, como mostrado na figura 10-A, e sistemas lamelares, classificados como STBV, mostraram presença de Cruz de Malta, conforme exibido na figura 10-B.

As regiões classificadas como STAV se mostraram como imagens com presença de estrias e cruces de Malta na interface da gota, sendo então característica de mistura de mesofases, no caso cristais líquidos com estrutura hexagonal e lamelar, como mostrado na figura 10-C, ou evidenciaram a presença apenas de estria, sendo indicativo de sistema hexagonal, sendo mostrado na figura 10-D.

Figura 12. Fotomicrografias obtidas por MLP das formulações sendo campo escuro (A), cruces de Malta (B), sistema composto por Cruces de Malta e estrias (C) e apenas estrias (D).



Para os diagramas estudados, na região de STL foi observado campo escuro na MPL sendo característicos de microemulsões, sistemas mesofásicos lamelares para a região de STBV, com presença de cruces de Malta, e sistemas hexagonais ou com uma mistura de mesofases lamelares para STAV devido a presença de estrias pela lâmina. A fase lamelar geralmente apresenta-se como líquido viscoso e a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel, enquanto que a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2002). Já as microemulsões se apresentam como líquidos e de fluxo livre, além de serem translúcidas (FORMARIZ *et al.*, 2005).

5.2 Seleção dos sistemas líquidos cristalinos

Os sistemas selecionados foram baseados na sua viscosidade, na concentração de 40% de PPG-5-CETETH-20, onde apresentam STBV e STAV para os sistemas contendo ou não quitosana e poloxâmero. Os pontos selecionados estão indicados no quadro 2 e são mostrados nos diagramas da figura 10.

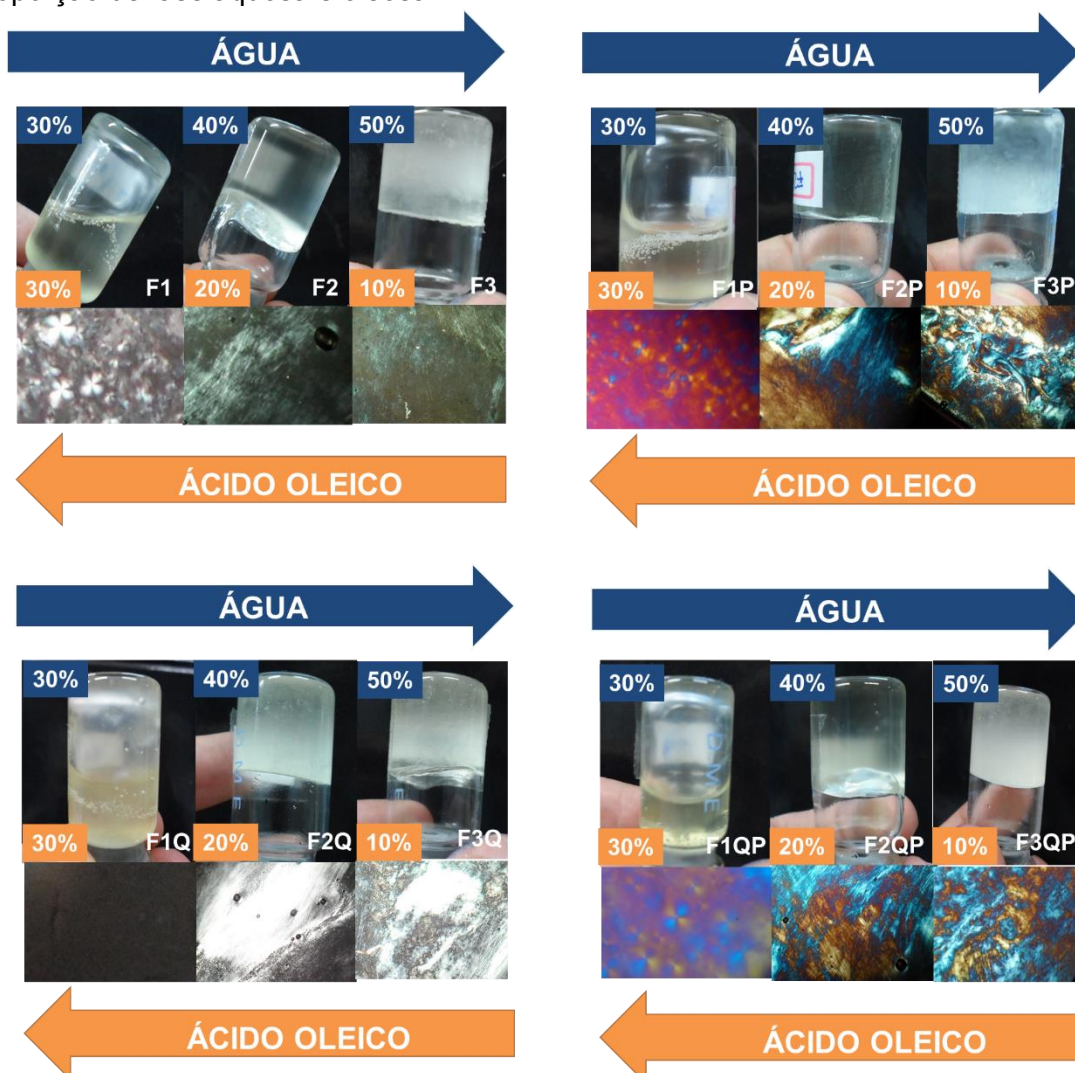
Na figura 13 é mostrado os pontos selecionados baseados nas áreas de transição de mesofases. É possível observar que as formulações com 30% de FA e 10% de AO (F1, F1QP e F1) possuem viscosidade, porém possuem algum fluxo, e

foram classificadas como STBV e quando caracterizadas por MLP se mostraram como cruces de Malta, exceto o sistema contendo apenas quitosana (F1).

As formulações compostas por 40% de FA e 20% de AO (F2, F2QP e F2P e F2Q) se mostraram como sistemas viscosos e sem escoamento dentro do frasco, então foram classificadas como STAV. Quando submetidas à caracterização por MLP mostraram-se como estrias por toda a lâmina, sendo indicativa de sistemas de mesofases líquido-cristalinas hexagonais.

O sistema que não possui os polímeros (F2) possui cruces de Malta com estrias, sendo indicativo de misturas de fases lamelares e hexagonais. O comportamento de sistema hexagonal foi observado também para os sistemas contendo 50% de FA e 10% de AO (F3, F3QP, F3P e F3P), sendo observados estrias e ausência de cruces de Malta.

Figura 13. Mudança de transição de fase dos sistemas liotrópicos selecionados em relação à proporção de fase aquosa e oleosa.



A MLP apresenta como uma técnica rápida e de baixo custo; entretanto, pode ser limitada quando a estrutura é cúbica sendo representada por campo escuro ou quando há uma mistura de fases dentro do sistema (MALMSTEN, 2002), devendo então ser analisadas por outras técnicas confirmatórias, como espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS), espalhamento de luz estático ou dinâmico, microscopia eletrônica de transmissão e ressonância magnética nuclear (RMN) (SHAH, SADHALE & CHILUKURI, 2001; MALMSTEN, 2002; PATEL & PATEL, 2010; LAWRENCE & REES, 2012).

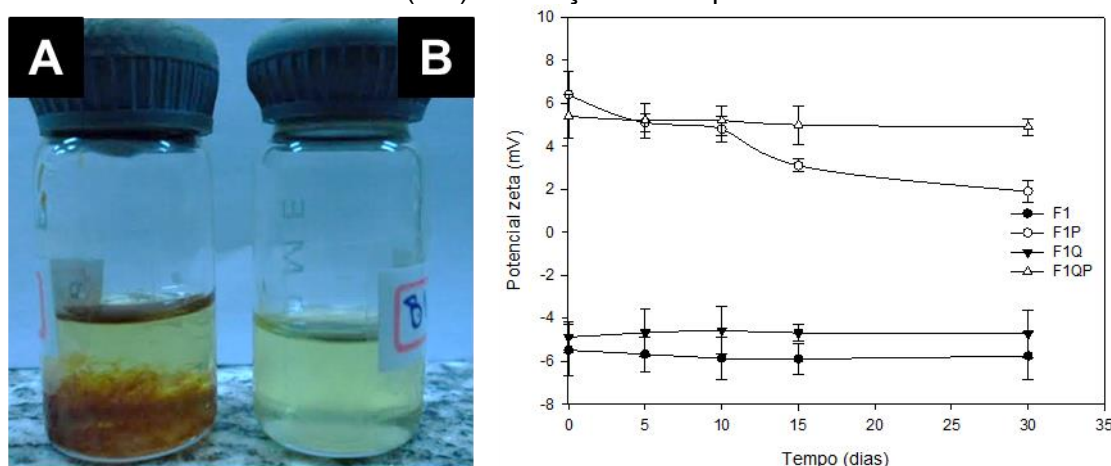
Os sistemas estudados mostraram uma boa estabilidade quando não acrescido de polímeros ou somente contendo poloxâmico, porém quando adicionado de quitosana, observou-se um processo de precipitação em até 15 dias

(Figura 14A). VARGAS *et al.* (2009) relataram que ocorre uma interação entre quitosana e ácido oleico que gera coalescência de gotículas na formação de filmes, além de reduzir o potencial zeta dos sistemas.

O gráfico apresentado na figura 14 mostra o potencial zeta em função do tempo, sendo que para os sistemas contendo quitosana, os valores do potencial zeta foram positivos, devido ao carregamento do grupo NH_3^+ , e para os sistemas contendo AO, acrescido ou não de poloxâmero, o valor foi negativo, devido aos grupamentos $-\text{COO}^-$ presentes na molécula. O interessante é que os sistemas contendo quitosana, como fase aquosa, mostraram redução de valores em função do tempo de 30 dias. Esse evento não tão pronunciado para os sistemas contendo quitosana e poloxâmeros. Os sistemas contendo água ou poloxâmeros como fase aquosa apresentaram potencial zeta constante por todo o período de tempo do teste.

Os dados corroboram com o estudo de HAM-PICHAVANT *et al.* (2005) que fundamentam que a redução da carga elétrica de partículas de quitosana-ácido oleico em conjunto com o aumento do teor de lipído pode ser explicado pelas interações eletrostáticas entre polímero e lipídio. Em pH 5,2, o grupo amino da quitosana ($\text{pK}_a \approx 6,5$) é carregado positivamente e pode ser parcialmente neutralizado através das interações com a função de carboxilato de ácido oleico ($\text{pK}_a \approx 4,8$), que é negativamente carregada (HAM-PICHAVANT *et al.*, 2005).

Figura 14. Aspecto macroscópico das formulações contendo quitosana (A) e com polímeros de quitosana e poloxâmero (B) após 15 dias do preparo. Gráfico mostrando o potencial zeta (mV) em função do tempo.



Para sistemas contendo poloxâmero e quitosana tal fenômeno não foi evidenciado. Isto pode ser explicado devido ao poloxâmero exibir propriedades de inibir a precipitação, conforme descrito por VUKIĆEVIĆ *et al.* (2014). O mecanismo proposto de inibição de precipitação pode ser atribuído à capacidade do poloxâmero para atuar como um doador de ligação de hidrogênio (WARREN *et al.*, 2010) ou também atuar como uma barreira mecânica para inibir o contato, evitando assim o agregamento de partículas devido à porção de óxido de etileno hidrofílico da molécula para sua estabilização estérica (CASTILE, TAYLOR & BUCKTON, 2001), inibindo o processo de nucleação e impedindo, assim, o crescimento de cristais (USUI *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2012).

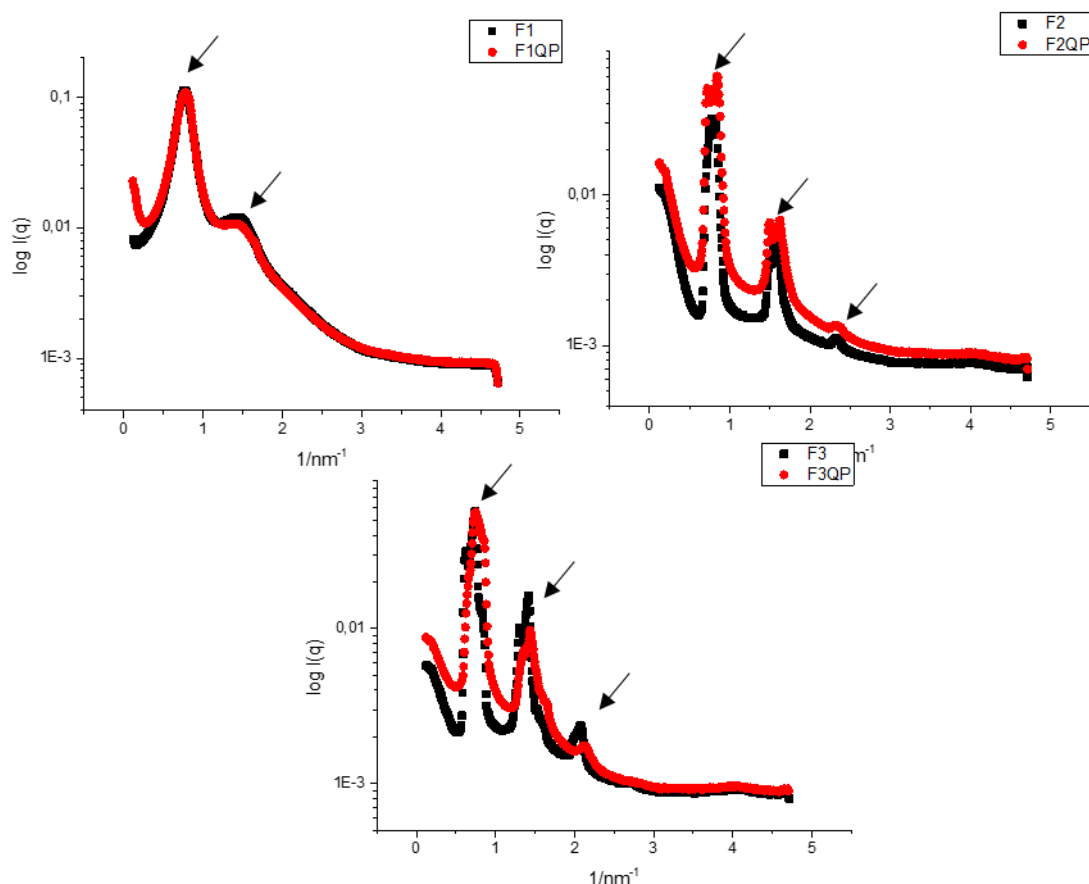
Esses dados reforçam que os sistemas contendo poloxâmeros podem ser interessantes, uma vez que a adição de outras classes de polímeros catiônicos podem interagir com lipídeos, constituintes de fases oleosas, em sistemas líquidos cristalinos. Dessa forma, o poloxâmero presente nas formulações pode evitar a instabilidade físico-química com o intuito de aumentar a estabilidade das formulações.

Pelos dados de estabilidade, foram selecionados os sistemas sem polímeros (F1, F2 e F3) e com quitosana acrescidos de poloxâmero (F1QP, F2QP e F3QP) para a fase de caracterização físico-química.

5.2.1 Caracterização por espalhamento de raios-X à baixo ângulo (SAXS)

O SAXS é uma ferramenta que tem sido muito empregada na elucidação estrutural de sistemas líquido-cristalinos, fornecendo informações sobre tamanho, forma, quantidade e arranjo dos objetos espalhadores da amostra. As curvas de SAXS para sistemas líquido-cristalinos exibem picos, cujo número e razão entre as distâncias de correlação permitem determinar o tipo de arranjo que os átomos formam na matriz (PATEL & PATEL, 2010). A figura 15 mostra as curvas de SAXS para os pontos selecionados nos diagramas de fase ternário.

Figura 15. Curvas de SAXS das formulações selecionadas de cristais líquidos com e sem quitosana e poloxâmero.



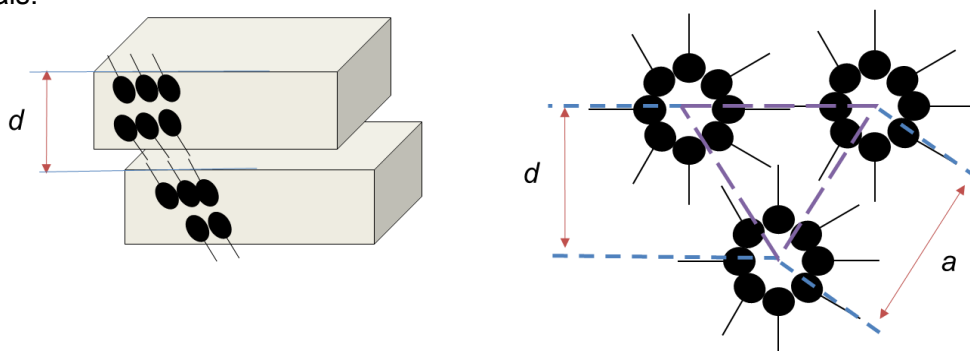
Os valores de espalhamento do vetor (q), correspondentes aos picos que são correlacionados com valores de 1:1,73:2,2,64. Estes valores de espalhamento são características de periodicidade de fase hexagonal. Os valores de (q) correspondentes aos picos em que se correlacionam 1:2:3, exibindo comportamento de liquido-cristalinos lamelares (ZHANG *et al.*, 2008). Já para os cristais líquidos de fase cúbica correlacionam-se os valores 1,41:1,73:2,82:3 (YARIV *et al.*, 2010). Os valores do vetor q e a relação das distâncias intraplanares são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de $q_{\max}$, razão entre as distâncias interplanares, distância entre planos (d) e aresta do hexágono (a) para as formulações estudadas.

	$q_{\max 1}$	$q_{\max 2}$	$q_{\max 3}$	d_2/d_1	d_3/d_1	Mesofase	d (nm)	a (nm)
F1	0,74	1,49	-	2	-	Lamelar	8,49	-
F2	0,80	1,40	2,34	1,73	3	Hexagonal	7,85	9,06
F3	0,78	1,41	2,34	1,73	3	Hexagonal	8,05	9,30
F1QP	0,75	1,48	-	2	-	Lamelar	8,37	-
F2QP	0,80	1,39	2,34	1,73	3	Hexagonal	7,85	9,06
F3QP	0,79	1,41	2,34	1,73	3	Hexagonal	7,95	9,18

Os resultados de SAXS corroboram com as informações obtidas pela MLP. Para os sistemas F1 e F1QP foi obtida razão de 2 nas distâncias dos picos interplanares. Pela literatura, eles podem ser descritos como sistemas lamelares. Na MPL, foi evidenciada a presença de cruces de Malta, evidenciando a autenticidade das duas técnicas. Os sistemas F2, F3, F2QP e F3QP, quando observados pela MLP, mostraram estruturas estriadas e que foram confirmadas por SAXS.

Os parâmetros de rede da microestrutura são representados pela distância entre planos (d , para estruturas lamelares) e pela aresta do hexágono (a) que se relaciona com a distância entre os planos que passam por dois cilindros adjacentes (d , para estrutura hexagonal) (SONI *et al.*, 2006), mostrados na figura 16.

Figura 16. Esquema ilustrativo do parâmetro de rede para fases cristalinas lamelares e hexagonais.

Adaptado de: SONI *et al.* (2006)

Os valores de distância entre planos (d) e aresta do hexágono (a) foram obtidos e mostraram valores em torno de 8 e 9 nm, respectivamente. O parâmetro de rede para fase cristalina é uma ferramenta importante para a caracterização de

sistema nanoestruturados. OYAFUSO *et al.* (2015) determinaram os valores de d para sistemas líquidos cristalinos entre 6-7 nm e observaram que uma maior organização nanoestruturada dos sistemas levam uma diminuição dos valores de d . (CARVALHO *et al.*, 2010c) relataram que os valores de d foram de 5,5 – 6,5 nm para sistemas de cristais líquidos formados por PPG-5-CETETH-20; entretanto, CARVALHO *et al.* (2010a) relataram que valores de d podem variar de 5 até 11 nm quando diluídos com fluído nasal simulado (FNS). Isto pode ser explicado devido ao fato de que o aumento de água no sistema que leva ao aumento da curvatura das cabeças polares do tensoativo, aumentando o parâmetro de empacotamento, gerando estruturas mais organizadas (MALMSTEN, 2007; MEZZENGA, 2012).

5.2.2 Caracterização reológica dos sistemas

5.2.2.1 Reologia oscilatória

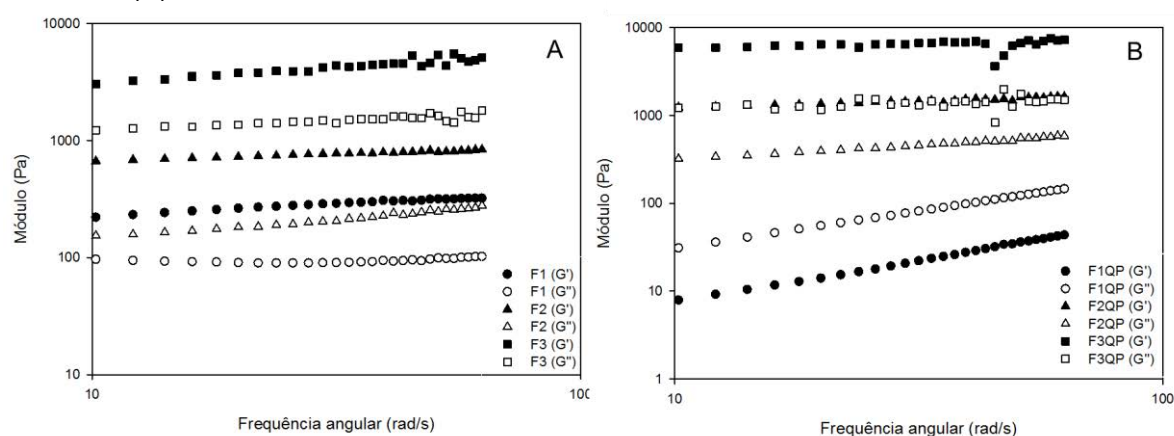
Para a determinação do comportamento dos sistemas líquidos cristalinos, foi realizada uma varredura de tensão em cada sistema obtido, com o objetivo de se determinar a região viscoelástica. A região viscoelástica é conhecida por ser a região onde a estrutura do gel é preservada, ou seja, os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') são independentes da frequência. É de fundamental importância a análise em regime oscilatório ser realizada nesta região, pois, de forma diferente, os valores dos módulos serão muito menores devido ao cisalhamento e à destruição da rede estrutural formada. A varredura de tensão mostrou um valor de cisalhamento de 0,5 Pa para os sistemas sem que haja destruição da rede formada, ou seja, módulos G' e G'' independentes.

O módulo de armazenamento é uma medida da energia armazenada e recuperada pelo ciclo de deformação e reflete um comportamento sólido de um material viscoelástico. Altos valores para o módulo de armazenamento refletem em uma amostra predominantemente elástica e altamente estruturada. O módulo de perda é uma medida da energia dissipada por ciclo e reflete o componente do tipo líquido. O módulo de perda com valores altos indicam que uma amostra é predominantemente viscosa (CALLENS *et al.*, 2003) e estruturas menos organizados (CARVALHO *et al.*, 2013).

A figura 17 mostra os módulos de perda e armazenamento dos sistemas líquidos cristalinos. É possível observar que sistemas lamelares (F1 e F1QP) possuem comportamento mais viscoso do que elástico ($G'' > G'$) para os sistemas contendo fase aquosa com polímeros do que com as formulações sem polímeros na fase aquosa ($G' > G''$), sendo então classificados como elásticos. Esse fenômeno pode ser devido à presença dos polímeros, que leva à formação de géis fracos e possuem uma fraca organização da estrutura. Sistemas lamelares já foram relatados como tendo um comportamento de um material viscoso ou gel, ao invés de elásticos, conforme publicado por SILVA *et al.* (2014).

As amostras de cristal líquido com mesofase hexagonal (F2, F3, F2QP e F3QP) apresentaram comportamento semelhante a um gel ou viscoso, sendo que G' foi maior do que G'' . O aumento do módulo de armazenamento evidenciando uma maior organização, em sistemas líquidos cristalinos, pelo aumento de fase aquosa foi confirmado por CARVALHO *et al.* (2013), sendo indicativo de uma maior organização desses sistemas. Altos valores de módulo de armazenamento também foram descritos por OYAFUSO *et al.* (2015) em sistemas líquidos cristalinos de fase cúbica, formados por ácidos graxos etoxilados, mostrando que a mesofase formada, do ponto de vista estrutural, é mais complexa e altamente organizada.

Figura 17. Espectro mecânico do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') em função da frequência para as formulações contendo fase aquosa sem polímeros (A) e com polímeros (B).



A variação do módulo de perda (G'') como uma ferramenta para evidenciação da estrutura formada vem sendo estudada para sistemas coloidais e líquido-cristalinos. O aumento para valores do G' , em relação à concentração de carbômero ou de policarbofil, foi evidenciado e indica que baixas concentrações do polímero em

água resultam comportamento viscoso e, o aumento da concentração leva a um comportamento elástico pela maior organização da rede tridimensional formada pelos géis (CARVALHO *et al.*, 2012; CALIXTO *et al.*, 2014).

Para sistemas formados por cristais líquidos, a estrutura formada mostra relação com os valores de G' e G'' , em sistemas lamelares, sendo o valor de $G'' > G'$ indicativo de uma estrutura menos organizada. Porém, para sistemas hexagonais e cúbicos, os quais se comportam como um gel viscoso, os valores para os módulos são $G' > G''$ são indicativos de uma maior organização e complexidade da estrutura formada (CARVALHO *et al.*, 2010a; CARVALHO *et al.*, 2010c; CARVALHO, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013; URBAN *et al.*, 2013; OYAFUSO *et al.*, 2015).

No intuito de se estabelecer uma análise quantitativa da dependência de G' da frequência foi determinado o valor de r a partir regressão linear, utilizando a equação da lei da potência dos dados obtidos a partir do espectro mecânico. Segundo SAXENA, KALOTI & BOHIDAR (2011), os parâmetros S e n são indicativos da densidade de reticulação da estrutura, sendo que quanto mais alto for o valor de S , mais reticulada e forte será a estrutura formada. Contrariamente, o valor de n diminui com o aumento da densidade de organização. Assim, valores de n altos indicam géis com estruturas mais fracas.

Analisando os dados da Tabela 2, nota-se que as formulações F1, F2 e f3 apresentam valores de S maiores quando se aumenta a proporção de água dentro do sistema, o que está em concordância com os espectros mecânicos. Além disso, as formulações F2QP e F3QP apresentaram maior estruturação até mesmo quando comparadas com as formulações sem polímeros. Isso indica a vantagem de se utilizar as dispersões adicionadas na fase aquosa de sistemas tensoativo/água.

Os valores de n para as amostras se mostram baixos sendo indicativos de estruturas mais fortes e a sua diminuição não é observada no grupo de formulações sem polímeros, exceto para a F2. Em contrapartida, o grupo de amostras que possuem polímeros na fase aquosa mostraram valores de n que variam de 0,98 à 0,07, sendo indicativo de um aumento da estruturação desses sistemas. A diminuição dos valores de n foram observadas para sistemas líquidos cristalinos conforme há o aumento de fase aquosa dos sistemas (CALIXTO, 2013).

Uma discreta diminuição dos valores de r para as formulações sem polímeros pode ser observada, embora quando esse valor é comparado com os obtidos para

as formulações com quitosana/poloxâmero, pode-se observar que a formulação F3QP mostrou um valor de r de 0,583. O valor de r mais próximo de 1 é indicativo da estruturação ser menos dependente da velocidade angular. Dessa forma, a amostra F3QP se mostrou menos dependente da velocidade com relação às demais amostras com polímeros da fase aquosa.

Tabela 2. Valores de regressão linear (r), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) das formulações contendo fase aquosa com e sem polímeros.

Formulação	S	n	R
F1	137,30	0,21	0,991
F2	511,20	0,12	0,993
F3	1574,00	0,29	0,943
F1QP	0,77	0,98	1,000
F2QP	863,80	0,15	0,979
F3QP	4984,00	0,07	0,583

O aumento da proporção de fase aquosa nos sistemas elevou os valores de S . Consequentemente, abaixou os valores de n para as amostras com polímeros na fase aquosa, estando de acordo com os resultados obtidos, o que demonstra que com a formação de mesofases líquido-cristalinas ocorre o aumento da estruturação do sistema (ZHENG *et al.*, 2011; CARVALHO, 2012; CALIXTO, 2013; BERNEGOSSI, 2014).

5.2.3 Caracterização mecânica dos sistemas

5.2.3.1 Análise do perfil de textura (TPA)

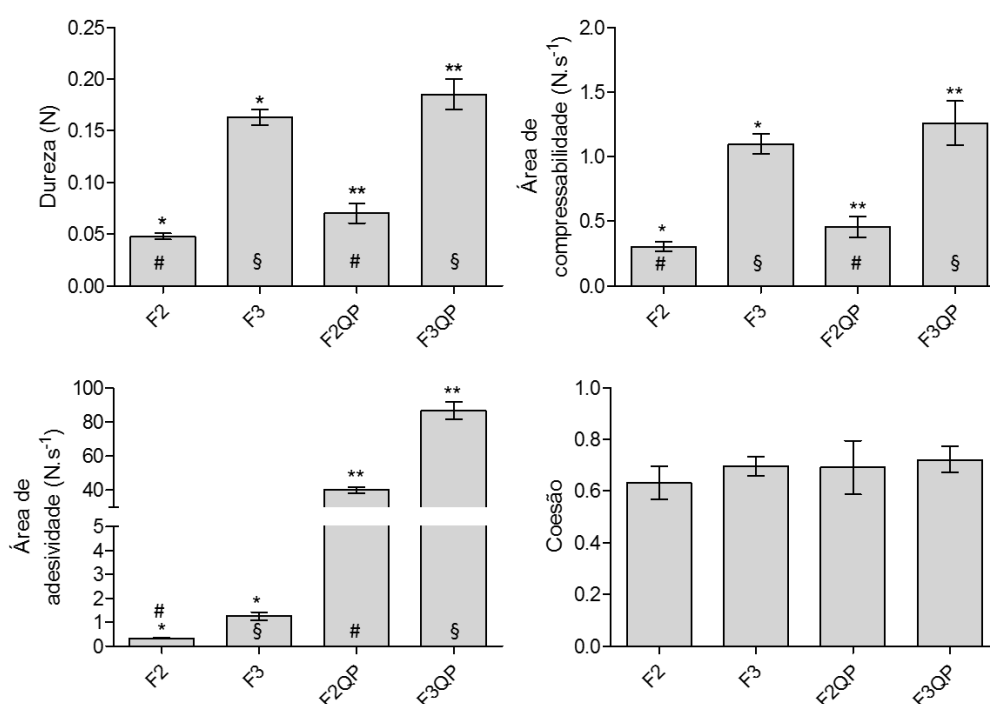
Um método que tem recebido uma atenção para a caracterização de sistemas farmacêuticos é a análise do perfil de textura (TPA). Nesta técnica, uma sonda analítica é duas vezes deprimida na amostra em análise, permitindo um período de recuperação definido entre as compressões sucessivas (JONES, WOOLFSON & BROWN, 1997a).

A partir do gráfico resultante força-tempo, vários parâmetros são derivados e estes podem estar diretamente relacionados ao desempenho da amostra. Estes parâmetros incluem: dureza- força necessária para atingir uma determinada

deformação; compressibilidade ou espalhamento- o trabalho necessário para deformar o produto durante o primeiro ciclo de compressão pela sonda; adesividade - trabalho necessário para vencer as forças de atração entre a superfície do produto e a superfície da sonda com a qual a amostra entra em contato (JONES, WOOLFSON & BROWN, 1997a; JONES, WOOLFSON & BROWN, 1997b); coesividade- razão entre a área da segunda pela primeira compressão (LAU, TANG & PAULSON, 2000).

Os resultados do TPA são mostrados na Figura 18 e neste ensaio não foram analisadas as amostras F1 e F1QP, já que as amostras eram coesas. Segundo BOURNE & SZCZESNIAK (1998), amostras líquidas podem não manter a sua forma, mas fluem por gravidade quando despejadas e submetidas à compressão uniaxial, sendo assim os parâmetros obtidos para esse tipo de amostra são discutidos sem considerar uma validade ou significado mecânico (BOURNE & SZCZESNIAK, 1998; NISHINARI *et al.*, 2013).

Figura 18. Gráficos de barra para as medidas de dureza, área de compressão, área de adesividade e coesão obtidos pela metodologia de TPA. Teste t unilateral com $\alpha = 0,05$, sendo * $p < 0,05$ para grupo sem polímeros na FA (F2 e F3); ** $p < 0,05$ para grupo com polímeros na FA (F2QP e F3QP); # $p < 0,05$ para grupo F2 vs. F2QP; § $p < 0,05$ para grupo F3 vs. F3QP.



Para o parâmetro dureza, pode-se observar que a incorporação de quitosana e poloxâmico para as formulações contendo 40% de óleo, 20% de água e 40% de

PPG-5-CETETH-20 (F2 e F2QP) leva a um aumento sobre dureza para a formulação F2QP. As formulações que contem 50% de óleo, 20% de água e 40% de PPG-5-CETETH-20 (F3 e F3QP) obtiveram dureza maiores em relação às formulações com e sem polímeros. O parâmetro dureza está relacionado com a força máxima para ocorrer a deformação num material (CIVILLE & SZCZESNIAK, 1973). Quando observa-se os sistemas precursores obtidos de F2 para F3 e de F2QP para F3QP pode-se verificar que os sistemas com polímeros possuem dureza maior em relação às formulações sem polímeros.

Quanto ao parâmetro compressibilidade, pode-se observar que as amostras F2 e F3 se mostram menores em relação ao grupo F2QP e F3QP, indicando que a compressibilidade dos sistemas é diretamente proporcional à dureza e estão relacionados com a organização nanoestruturada do sistema.

As propriedades de adesividade estão relacionadas como a energia necessária para superar as forças atrativas entre a superfície da formulação com outros materiais com qual está em contato (CIVILLE & SZCZESNIAK, 1973). As áreas de adesão foram crescentes para os sistemas, sendo que foram superiores para os sistemas contendo polímeros.

A coesão é uma medida do grau de dificuldade de quebrar a estrutura interna da rede formada por géis (LAU, TANG & PAULSON, 2000). Segundo LAU, TANG & PAULSON (2000) a diminuição da coesão dos géis de gelana/gelatina, quando foram adicionados os íons de cálcio, foi devido à formação de estrutura interna do gel sem adição de cálcio ser mais difícil de quebrar durante a primeira compressão do que para os géis com a adição de cálcio.

Os valores de coesão para os sistemas não foram significativos ($p > 0,05$) para os sistemas estudados, indicando que os sistemas são estruturados e estes são mais fáceis de romper na primeira compressão, porém se mantêm estruturados.

A análise estatística pelo teste de t mostrou que para os parâmetros de TPA obtidos para grupo sem polímeros (F2 e F3) e para grupo com polímeros (F2QP e F3QP), as médias foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre duas as formulações precursoras de cada grupo.

5.2.4 Estudo de mucoadesão *in vitro*

A bioadesão tem sido referida como a adesão entre um material sintético ou natural e a superfície de um tecido, nomeadamente o epitélio da mucosa. O termo mucoadesão é utilizado quando a adesão ocorre entre o material e a camada de muco que reveste a mucosa (SMART, 2005a).

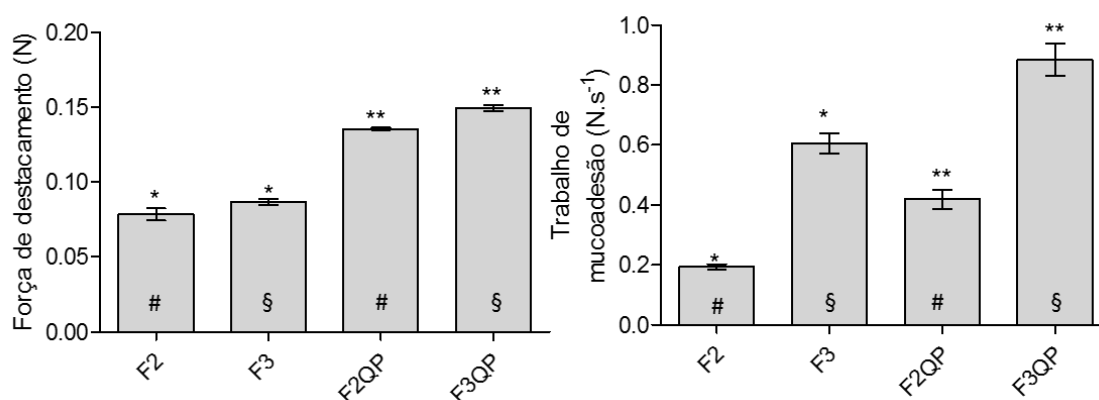
Com o desenvolvimento de materiais adesivos mais eficientes, é possível conceber sistemas com propriedades mucoadesivas adequadas para veiculação de vários fármacos para serem administrados por diferentes vias e, assim, controlar a liberação, diminuindo os efeitos sistêmicos indesejáveis ou melhorar a absorção e o transporte de fármacos pela membrana biológica (KOCKISCH *et al.*, 2001).

A figura 19 mostra a força de trabalho de mucoadesão e área de trabalho de mucoadesão para as amostras desenvolvidas. As amostras líquidas não evidenciaram força ou área de mucoadesão. Isso é devido à falta de coesão do sistema. Contudo, foi possível observar que havia amostra aderida ao tecido, sugerindo que existe interação da formulação com a mucosa biológica. Os sistemas formados por mesofase hexagonal obtivam força e área de mucoadesão dependente da quantidade de água no sistema.

Os resultados mostram que os sistemas se diferem quanto à resposta nos parâmetros de mucoadesão com a adição ou sem polímeros, sendo que com a adição de polímeros a força necessária para o destacamento da amostra foi maior, assim como a área de trabalho de trabalho de mucoadesão. Isso pode ser explicado, de forma sugestiva, pelo fato de polímeros hidrofílicos em sistemas hexagonais podem permanecer nos canais formados por água no interior do cilindro organizado por óleos e tensoativos gerando um sistemas com uma dureza elevada, como foi descrito no TPA.

Os resultados de reologia mostraram que nos sistemas contendo polímeros o módulo de elasticidade (G') foi maior quando comparado com os sistemas sem polímeros, sendo indicativo de uma estruturação mais organizada, que reforçam os valores elevados de mucoadesão para ambos os sistemas. A análise estatística mostrou que as médias diferem entre si para as formulações do grupo com polímero e do grupo sem polímero.

Figura 19. Gráficos de barra para as medidas de força e área de mucoadesão obtidos pela metodologia de mucoadesão *in vitro*. Teste t unilateral com $\alpha = 0,05$, sendo * $p < 0,05$ para grupo sem polímeros (F2 e F3); ** $p < 0,05$ para grupo sem polímeros (F2QP e F3QP); # $p < 0,05$ para grupo F2 vs. F2QP; § $p < 0,05$ para grupo F3 vs. F3QP.



Altos valores de trabalho de mucoadesão são relatados na literatura para géis de policarbofí e carbômeros, que são amplamente utilizados pelas suas propriedades bioadesivas na mucosa bucal (CARVALHO *et al.*, 2012; CALIXTO *et al.*, 2014). Os valores de força e trabalho de mucoadesão foram semelhantes aos géis de policarbofí, sendo indicativos da aplicação de cristais líquidos para a via bucal. É importante ressaltar que estudo realizado por CARVALHO *et al.* (2012) reporta que para os valores de dureza e adesão existe uma correlação direta com os valores de força e área de mucoadesão.

5.2.5 Discussão geral das propriedades físico-químicas, reológicas, mecânicas e mucoadesivas de sistemas líquidos cristalinos

O desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos obtidos neste trabalho mostrou que o decréscimo ou acréscimo de componentes aquosos ou oleoso, em uma quantidade fixa de PPG-5-CETETH-20, gerou estruturas mesofásicas diferenciadas. Com o aumento de FA, os sistemas mostraram uma transição de fase, de lamelar para hexagonal, evidenciando que a adição de água no sistema leva à uma maior solvatação da cabeças polar do tensoativo, aumentando o empacotamento da estrutura formada, gerando estruturas hexagonais.

A MPL e análise de SAXS evidenciaram e foram complementares quanto às estruturas formadas, classificando as formulações obtidas em lamelares e hexagonais. Além disso, a adição de polímeros na fase aquosa não alterou o tipo de estrutura formada. Os parâmetros de distância entre planos (d) para sistemas lamelares e hexagonais, e aresta do hexágono (a), para mesofases hexagonais, mostram valores na escala nanométrica, evidenciando a nanoestrutura dos sistemas formados.

As propriedades reológicas dos sistemas estudados mostraram que a adição de polímeros na FA, na fase lamelar, levou à uma desestruturação do sistema formado, sendo viscosos, quando comparado com a fase lamelar sem polímeros na FA, com comportamento elástico. Por outro lado, os sistemas hexagonais se mostraram estruturados, sendo classificados como materiais elásticos, e os valores do módulo elástico foram crescentes com o aumento de água no sistema.

A análise de textura mostrou que a adição de polímeros na FA influenciou nos parâmetros dureza, adesividade e compressão. A adesividade é um parâmetro importante no delineamento de formas farmacêuticas mucoadesivas, pois é a força que a amostra exerce na sonda analítica, que indica a capacidade de aderência da formulação sobre uma superfície.

As propriedades mucoadesivas dos sistemas lamelares não foram evidenciadas por causa das formulações serem líquidas e não coesas, porém foi observado a aderência da formulação na mucosa tachada na sonda analítica, sendo um indicativo de propriedades mucoadesivas. As amostras com mesofases hexagonais se comportaram exibindo força e trabalho de mucoadesão, sendo que foram dependentes e podem ser correlacionadas com tipo de estruturação evidenciada pela estrutura formada pelos ensaios reológicos.

As amostras que continham polímeros na FA exibiram uma maior força e trabalho de mucoadesão quando comparados com as formulações sem polímeros na FA. Esse fenômeno sugere que haja uma interação entre as cargas positivas da quitosana com a carga negativa dos grupamentos da mucina presente na mucosa. A adição de polímeros na FA exibe uma ação sinérgica sobre a propriedade mucoadesiva, sendo interessantes para sistemas de liberação mucoadesivos.

Os sistemas desenvolvidos se mostraram promissores devido às propriedades mucoadesivas para a aplicabilidade na via bucal, e podem também ser exploradas para outras mucosas, como a nasal ou vaginal, por exemplo, ou para o uso cutâneo.

O delineamento de SPCL pode ser explorado, pois no diagrama ternário de fases são mostradas regiões que, com o aumento de FA, aumentam a viscosidade e transitam de uma fase lamelar para hexagonal.

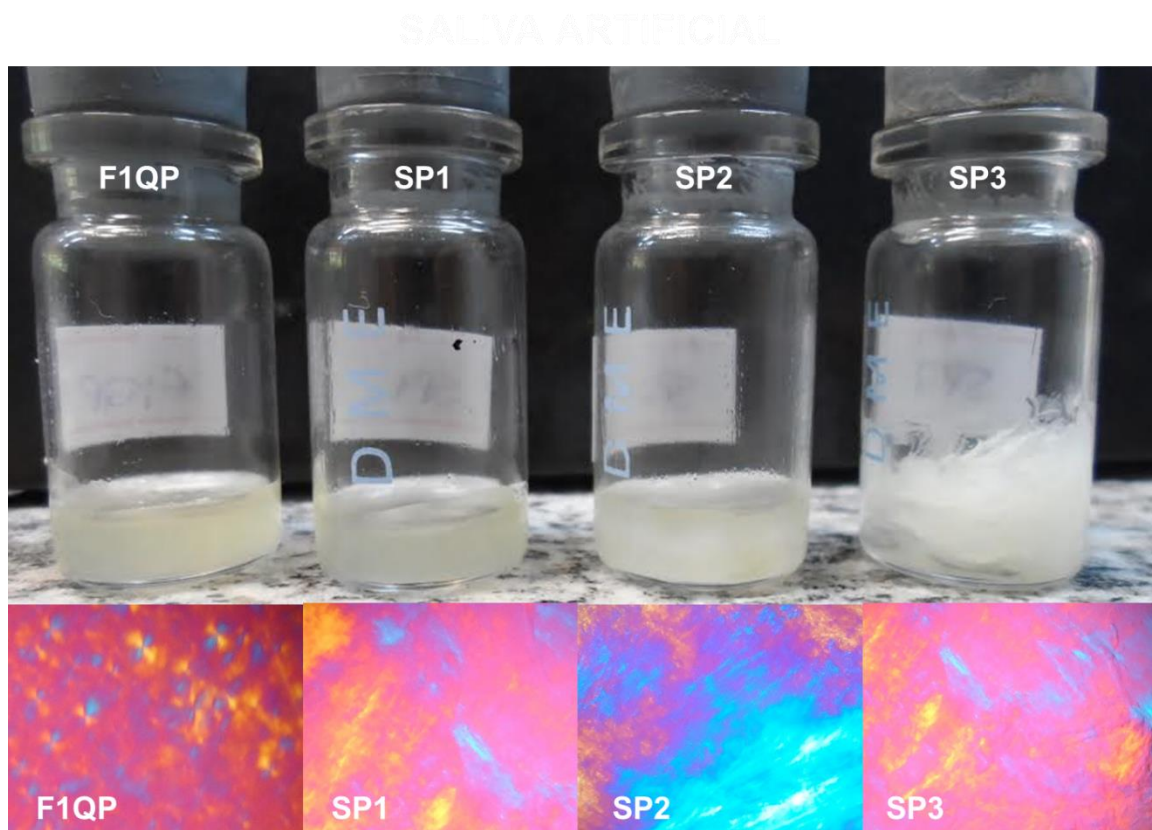
5.3 Estudo de desenvolvimento de SPCL com aplicabilidade para a via bucal

Sistemas precursores de mesofases líquido-cristalinas podem ser definidos como sistemas de baixa viscosidade, que em contato com um fluído biológico, podem alterar a sua mesofase, ocorrendo uma transição, gerando estruturas mais organizadas e aumento a viscosidade (CARVALHO *et al.*, 2013). Sistemas muito viscosos podem sofrer dificuldade para serem administrados através da mucosa (CARVALHO *et al.*, 2010b), e sistemas mais fluídos podem ser administrados mais facilmente no sítio bucal (BRUSCHI *et al.*, 2007; BRUSCHI *et al.*, 2008). Sistemas mucoadesivos com baixa viscosidade são interessantes para uma maior espalhabilidade do sistema ao longo da mucosa (PATEL & PATEL, 2010; GILHOTRA *et al.*, 2014), e o aumento da viscosidade pode resultar num maior tempo de residência da forma farmacêutica (BRUSCHI *et al.*, 2008; GILHOTRA *et al.*, 2014).

A baixa retenção de géis no local de aplicação foi ultrapassada pela utilização de formulações mucoadesivas. Certos polímeros com propriedade mucoadesiva, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, derivados do ácido acrílico, ácido hialurônico,, são submetidos a uma mudança de estado, mediadas pelo pH do local, de líquido a semissólido (BODDUPALLI *et al.*, 2010). Esse comportamento de mudança de viscosidade é interessante para sistemas de cristais líquidos, onde se apresentam na forma líquida, e com a incorporação de saliva se tornam mais viscoso (FEHÉR, ERÖS & I, 2005; BRUSCHI *et al.*, 2008; CALIXTO, 2013; BERNEGOSI, 2014).

Para inquirir o potencial de SPLC, foi utilizada a formulação F1QP, em virtude do potencial mucoadesivo observado no estudo anterior pela adição de quitosana/poloxâmero na FA. O sistema foi diluído com saliva artificial, em proporções que variam de 10 – 30%, onde foi observada a mudança de viscosidade com a diluição. A figura 20 evidencia que a diluição leva a uma transição de

Figura 21. Aspecto macroscópico das formulações diluídas com saliva artivial e MLP obtidas das formulações de SPCL.



Sistemas compostos por PPG-5-CETETH-20 e ácido oleico já foram estudados anteriormente para aplicação para a via nasal (CARVALHO *et al.*, 2010a; CARVALHO *et al.*, 2010c; CARVALHO, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013) e os resultados apresentados aqui corroboram que a capacidade de mudança de fase pela diluição do sistema,. Tais sistemas podem ser aplicados para outras vias de administração, sendo uma plataforma interessante para sistemas de liberação de fármacos.

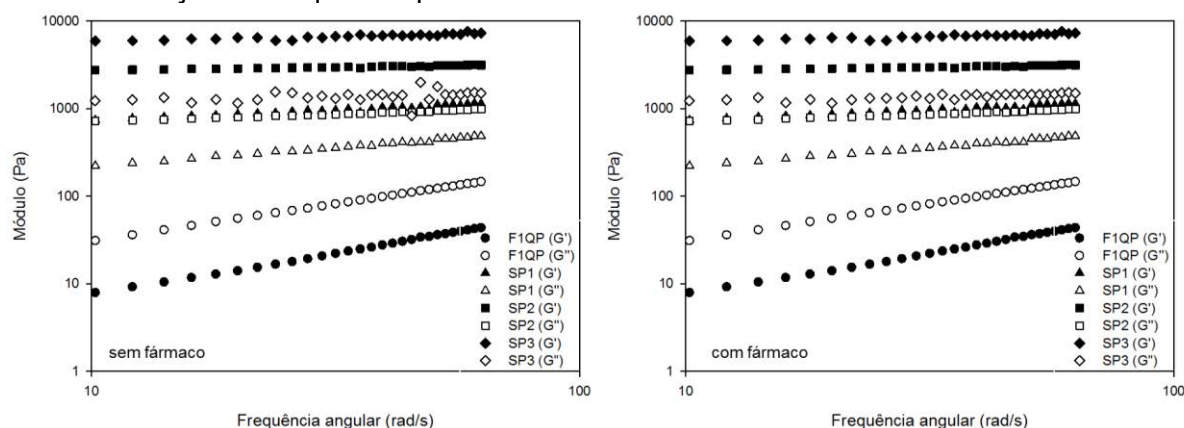
5.3.1 Caracterização reológica dos sistemas

5.3.1.1 Reologia oscilatória

O espectro mecânico, mostrado na figura 22, mostrou que os valores de G' foram maiores para o sistema hexagonal formado, indicativo de estruturação do sistema. O perfil dos resultados está em conformidade com o estudo de CARVALHO (2012), onde a adição de solvente gera sistemas mais estruturados, ou com

comportamento de géis elásticos. Além disso, o aumento da elasticidade no sistema foi dependente da concentração de saliva adicionada.

Figura 22. Espectro mecânico do módulo de armazenamento (G') e de perda (G'') em função da frequência para os SPCL contendo ou não contendo fármaco.



O aumento do módulo de armazenamento ou elástico foi investigado por vários autores no estudo de estruturação de sistemas farmacêuticos. Géis de poloxâmeros se baseiam na mesma propriedade de SPLC, porém o aumento de viscosidade ocorre pelo aumento de temperatura (CHANG *et al.*, 2002; YUN CHANG *et al.*, 2002; BRUSCHI *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2009; GRATIERI *et al.*, 2010). Em géis de poloxâmeros a transição sol-gel leva ao aumento a viscosidade e contribui para o aumento do módulo elástico desses sistemas, além de mostrar propriedades bioadesivas (DUMORTIER *et al.*, 2006).

A análise quantitativa dos espectros mecânicos, na tabela 3, mostrou resultados para S crescentes para os SPCL com e sem fármaco, indicando uma estruturação do sistema conforme ocorre a diluição, transitando de fase lamelar para hexagonal. Os valores de n mostraram ser decrescente com o aumento de água, indicando uma organização mais complexa, e os valores de r foram próximos a 1, indicando que os sistemas são dependentes da frequência angular, porém com a diluição dos sistemas os valores de r sofrem uma discreta diminuição. Os dados quantitativos mostram que a adição de fármaco ao sistema levou valores de S maiores, indicando que o fármaco interage com as mesofases formadas, podendo levar à uma maior organização estrutural dos sistemas.

Tabela 3. Valores de regressão linear (r), da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) dos SPCL contendo ou não fármaco.

Formulação	S	n	r
F1QP	137,3	0,21	0,991
SP1	421,9	0,24	0,980
SP2	487,5	0,24	0,975
SP3	4426,0	0,12	0,930
F1QPC	140,2	0,25	0,992
SP1C	421,9	0,24	0,980
SP2C	481,4	0,17	0,960
SP3C	4436,2	0,12	0,931

CARVALHO *et al.* (2012) reportaram que a elasticidade, ou estruturação, é dependente da concentração de polímero, em sistemas farmacêuticos geleificados, resultam no aumento das propriedades mecânicas e mucoadesivas. O comportamento evidenciado pelos autores corrobora com o comportamento dos SPCL, onde o aumento do módulo elástico foi dependente da concentração de água presente no sistema, tornando sistemas mais organizados estruturalmente.

5.3.2 Caracterização mecânica dos SPCL

5.3.2.1 Análise do perfil de textura (TPA)

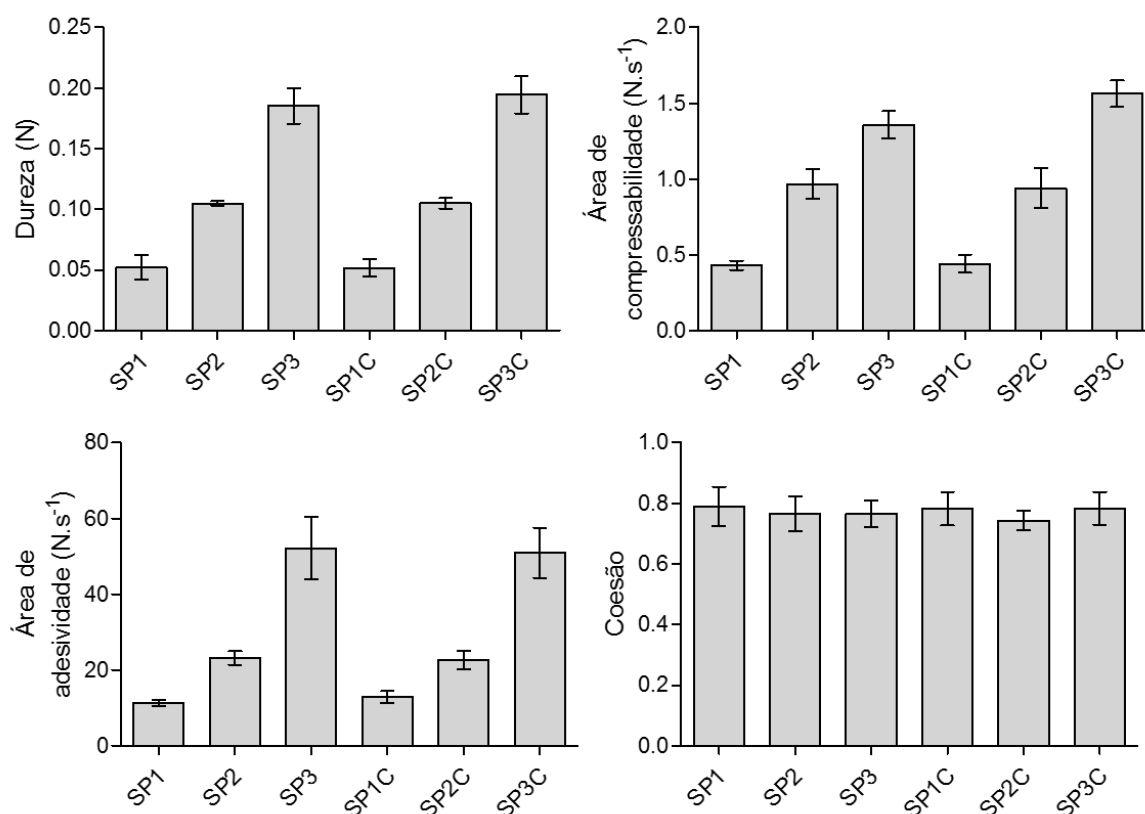
Os testes de propriedades mecânicas das formulações são de grande importância no delineamento de sistema de liberação de fármacos para a via bucal (JONES, WOOLFSON & BROWN, 1997a; BRUSCHI *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2009). A figura 23 mostra os parâmetros estudados para as formulações, onde foram misturadas como a saliva artificial, a fim de investigar as mudanças que podem ocorrer na textura dos sistemas quando entrar em contato com a saliva presente no ambiente bucal.

Os resultados obtidos, mostrados na Figura 23, a partir da análise do perfil de textura das amostras evidenciaram que a diluição dos sistemas gera respostas dependente para os parâmetros estudados, sendo indicativo de uma maior organização estrutural da fase hexagonal formada. A adição de curcumina aos

sistemas não alterou os parâmetros de textura de forma significativa quando comparado aos mesmos sistemas sem fármaco ($p < 0,05$, teste t *Student*).

A diluição de sistema gera um aumento da viscosidade que aumentam os valores de dureza e compressibilidade. Conforme foi estudado por vários autores, o aumento das concentrações de polímeros em uma dispersão polimérica, aumenta a viscosidade, e gera valores dependentes e crescentes para dureza e compressibilidade (JONES, WOOLFSON & BROWN, 1997b; CARVALHO *et al.*, 2012; CALIXTO *et al.*, 2014). O parâmetro de compressibilidade tem uma relação com a espalhabilidade de um produto (LUCERO, VIGO & LEÓN, 1994) relacionado com a viscosidade aparente da formulação.

Figura 23. Gráficos de barra para as medidas de dureza, área de compressão, área de adesividade e coesão obtidos pela metodologia de TPA das formulações de SPCL contendo e não contendo curcumina.



Os valores de dureza e compressibilidade obtidos para todas as amostras foram semelhantes aos obtidos para géis bucais de poloxâmeros, contendo fase aquosa, com o polímero carbopol, conforme relatado no estudo de (BRUSCHI *et al.*, 2007). Os valores obtidos para a média da área de adesividade foram superiores

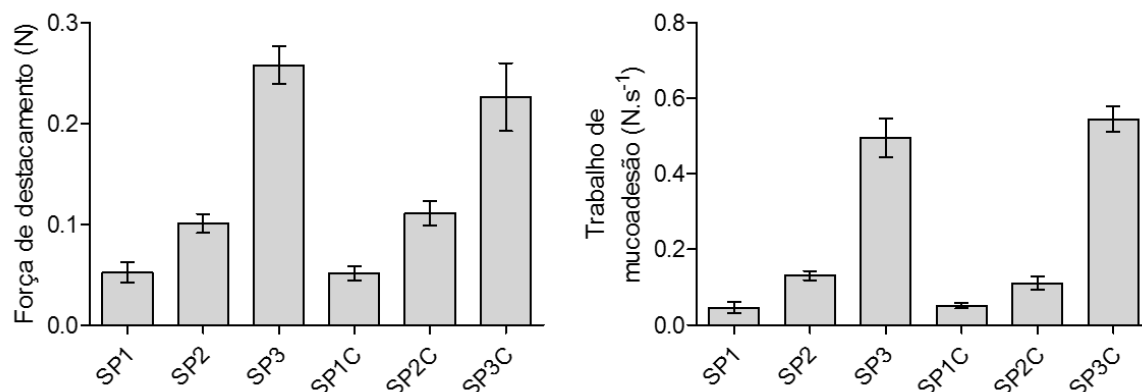
quando comparado aos valores obtidos em estudo conduzido pelos autores. A maior aderência de uma formulação é devido ao aumento das interações entre as moléculas da formulação com a sonda analítica e também devido ao aumento da aderência da forma farmacêutica (BRUSCHI *et al.*, 2008) contribuindo para a bioadesão. Dessa maneira, sistemas farmacêuticos que modificam seu comportamento reológico quando entram em contato com o meio fisiológico aquoso, são comumente empregados para atribuir as propriedades mucoadesivas e reológicas em um sítio anatômico específico (CARVALHO, CHORILLI & GREMIÃO, 2014).

5.3.3 Estudo de mucoadesão *in vitro* dos SPCL

Para conceber sistemas de liberação de fármacos com propriedades mucoadesivas excelentes, tais como cristais líquidos, é necessário o desenvolvimento de testes de mucoadesão, com metodologias simples, que possam avaliar tais propriedades mucoadesivas (TAKEUCHI *et al.*, 2005; YU, ANDREWS & JONES, 2014).

Os valores para força e trabalho de mucoadesão são mostrados na figura 24. Para as formulações precursoras é observado um aumento da força mucoadesiva e do trabalho. A adição de saliva gerou uma propriedade mucoadesiva crescente e dependente, podendo ser correlacionado com aumento da viscosidade das formulações. Essa propriedade de aumentar a viscosidade em géis de poloxâmeros, como sistemas temperatura-dependente, e de dispersões poliméricas, como sistemas pH-responsivos, também é descrita na literatura como uma propriedade que facilita a mucoadesão em diferentes mucosas (CHANG *et al.*, 2002; DUMORTIER *et al.*, 2006; BRUSCHI *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2009; GRATIERI *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2012; YUAN *et al.*, 2012; ABHIRAMI *et al.*, 2014; RAI *et al.*, 2014).

Figura 24. Gráficos de barra para as medidas de força e área de mucoadesão obtidos pela metodologia de mucoadesão *in vitro* dos SPCL contendo e não contendo curcumina.



Por outro lado, a água presente nas formulações pode participar do processo de mucoadesão, assim como também o tensoativo pode interagir com os componentes da matriz, por interações hidrofóbicas, forças van der Waals e por ligações de hidrogênio (YU, ANDREWS & JONES, 2014). Para sistemas líquidos cristalinos, pode ocorrer uma interação com a água presente na mucosa, levando a uma desidratação da amostra (NIELSEN, SCHUBERT & HANSEN, 1998; CREMONEZ, BENTLEY & LARA, 2013), contribuindo para o processo de mucoadesão. Devido ao fato de que os sistemas líquidos cristalinos podem sofrer mudanças na sua mesofase, sugere-se que a água presente na mucosa possa interagir com domínios aquosos da estrutura líquido-cristalina, levando a esse processo de mucoadesão.

A natureza catiônica polieletrólita da quitosana pode proporcionar uma forte interação eletrostática com muco ou a superfície da mucosa que são carregadas negativamente (SMART, 2005a). A quitosana presente na FA dos sistemas pode ter contribuído também para o processo de mucoadesão. Na fase de pré-formulação deste estudo, foi possível observar o efeito sinérgico sobre a mucoadesão quando foi realizada a adição deste polímero na FA de sistemas formados por cristais líquidos formado por PPG-5-CETETH-20/ácido oleico/água.

Adicionalmente, a quitosana, por ser carregada positivamente, pode interagir com as células tumorais, que possuem fosfatidilserina, um fosfolípido aniônico, na membrana celular, podendo contribuir a adesão com a superfície celular carregada negativamente (YANG *et al.*, 2009). Por isso, a utilização de sistemas contendo

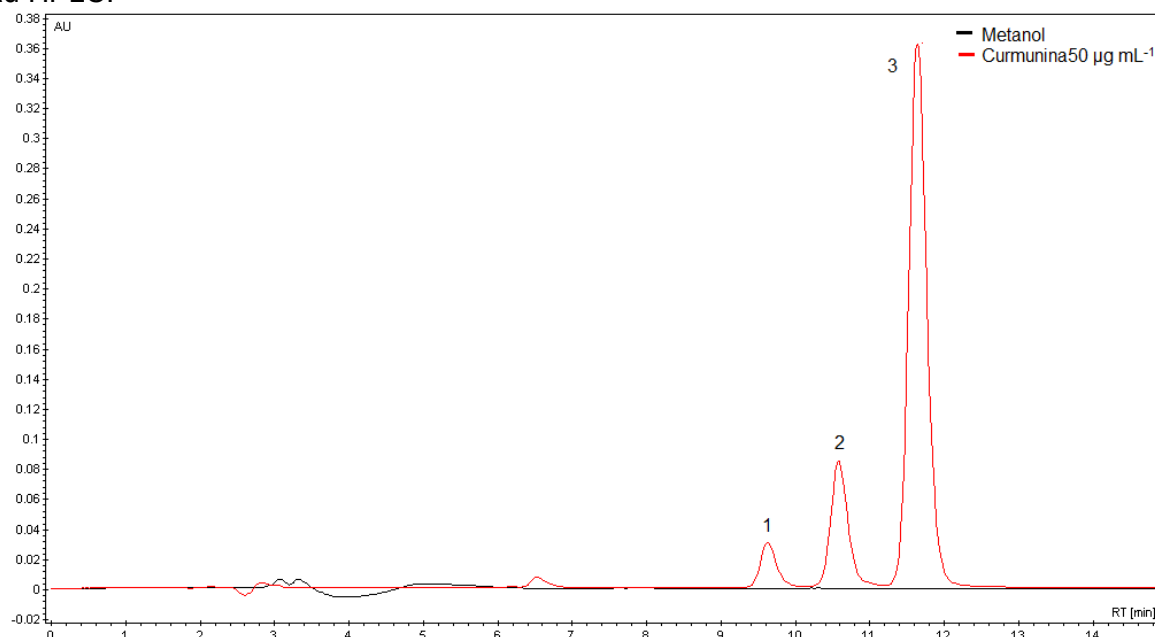
quitosana se tornam tão interessantes no desenvolvimento de sistemas mucoadesivos para o tratamento local de tumores em mucosas.

5.4 Desenvolvimento do método analítico por CLAE para determinação de curcumina

Um método foi desenvolvido para análise qualitativa da curcumina. O método mostrou uma separação satisfatória da curcumina, o principal componente nos extratos *C. longa*, com boa resolução dentro de um curto espaço de tempo, utilizando um método isocrático. Foi observado a presença de curcuminoides, como a desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, já sendo reportada a presença destes metabólitos no extrato da Sigma-Aldrich® (ADACHI, ANDO & WATANABE, 2002; FIROUZI *et al.*, 2014).

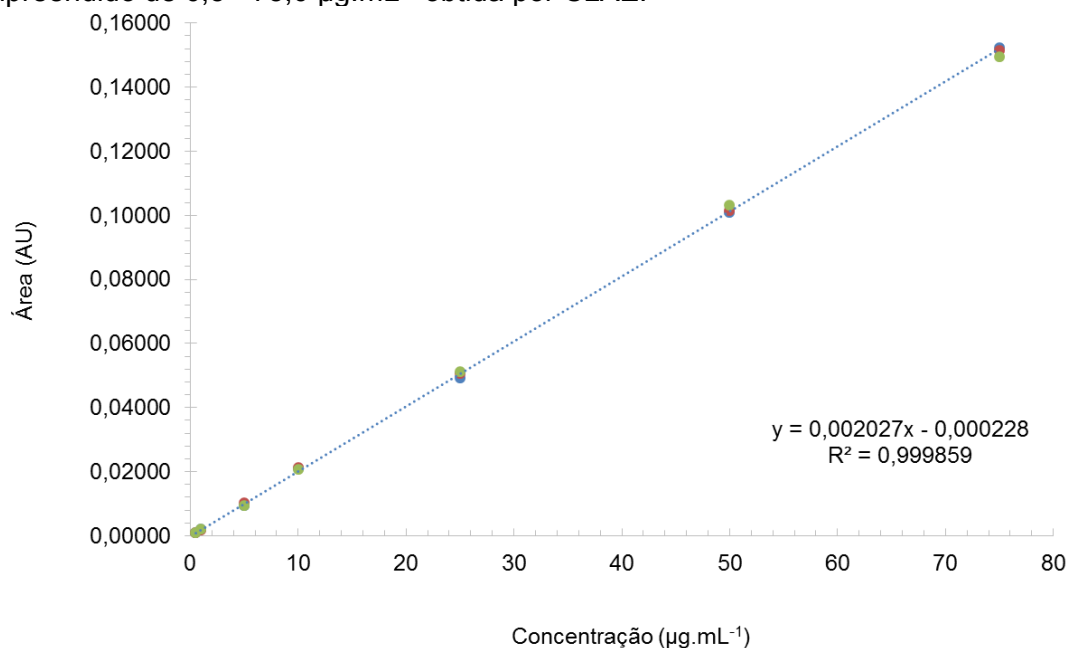
O cromatograma mostrou 3 picos de retenção em 11 minutos para a curcumina (3) (Figura 25), e dois primeiros picos para desmetoxicurcumina (2) e bisdesmetoxicurcumina (1), conforme reportado por WICHITNITHAD *et al.* (2009). A diferença do método adaptado e do método original, se baseia no fluxo da fase móvel e ajuste do gradiente da fase móvel, já que no método proposto por WICHITNITHAD *et al.* (2009) o fluxo é de 2,0 mL por minuto e a coluna C₁₈ utilizada foi de 15 cm. O método desenvolvido para este trabalho foi utilizado uma coluna C18 de 25 cm, dessa forma a análise foi longa, nas condições originais, em torno de 50 minutos, e o fluxo foi diminuído para 1,2 mL por minutos e a polaridade da fase móvel foi aletrada, de forma, para eluir de forma mais rápida os compostos, gerando um tempo de análise de 15 minutos, com um tempo de retenção para a curcumina de 11 minutos.

Figura 25. Cromatograma da curcumina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em metanol e do solvente metanol grau HPLC.



A curva de calibração para a curcumina provou ser linear ao longo do intervalo proposto ($0,5\text{-}75 \mu\text{g.mL}^{-1}$), como mostrado pelos coeficientes de regressão linear (r^2) de 0,9998 para o composto estudado, demonstrando um ajuste aceitável de dados para a linha de regressão ($y = 0,002027x - 0,000228$), conforme mostrado na figura 26.

Figura 26. Curvas padrão de curcumina em metanol com intervalo de concentração compreendido de $0,5 - 75,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtida por CLAE.



A análise estatística de regressão linear obtida a partir de um F_{calc} (80.768,65) em comparação com F_{tab} ($6,1 \times 10^{-36}$) demonstra a significância estatística do método de linearidade. A sensibilidade do método para o composto foi expressa pela inclinação da curva analítica, e pelos valores LQ e LD de 35,1 e 11,61 ng mL⁻¹, respectivamente.

A precisão do padrão na amostra foi avaliada em três níveis: 10, 50 e 70 µg mL⁻¹ para a curcumina, com recuperações de 101, 102,2 e 100%, respectivamente. O método mostrou boa precisão em concentração baixa, média e de alto nível para o analito, dentro da linearidade do método. Um valor de DPR < 3,0% foi observado em todas as determinações do teste de recuperação. Tanto as corridas intra- e inter-dia apresentaram valores de DPR menores que 3,0% e os valores de p obtido pelo teste t foram maiores que 0,05 mostrando que as médias de concentrações foram estatisticamente iguais no ensaio da corrida intra-dia. Estes resultados mostram a alta precisão do método para a determinação do método de análise (Tabela 4).

Tabela 4. Precisão intra-corrida e precisão intermediária do método avaliado em concentrações diferentes de curcumina.

Concentração teórica (µg mL ⁻¹)	Concentração Experimental ^a (µg mL ⁻¹)		DPR (%)		Exatidão (%)		Valor p ^b
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	
1,0	1,01 ±0,02	1,01 ±0,013	1,98	1,25	101,0	100,8	0,5000
50,0	50,33±0,05	50,7 ±0,61	0,1	1,20	100,7	101,4	0,2576
70,0	70,4 ±0,7	70,03 ±0,208	0,3	0,99	100,0	100,6	0,2168

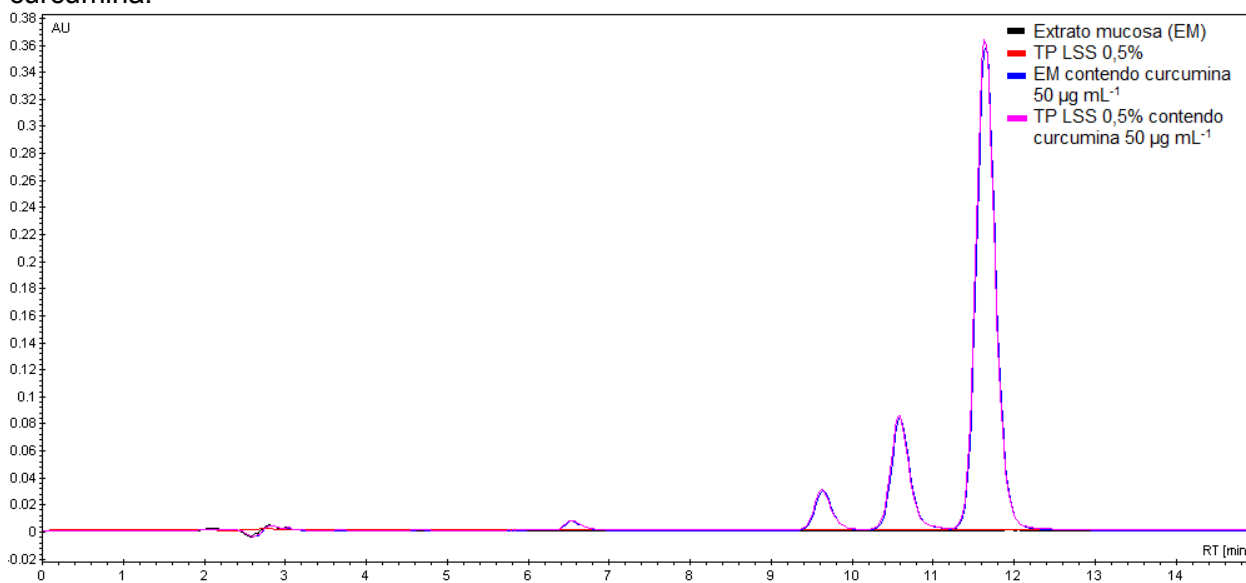
^a Média e desvio padrão

^b Teste t *Student* com nível de significância de 95%

A especificidade foi avaliada pela injeção das matrizes estudadas sem fármacos e com a adição de 50 µg mL⁻¹ de curcumina. O cromatograma dessas análises é mostrado na figura 27. Pode-se observar que as matrizes sem curcumina

não exibiram nenhum pico de retenção no tempo de 11 minutos. Esses resultados indicam que os componentes presentes nessas matrizes não interferem na análise, assim não é necessário nenhum processamento de extração para as amostras.

Figura 27. Cromatograma da solução branca de extrato metanólico da mucosa e tampão fosfato (TP) contendo LSS 0,5% e das soluções contaminadas com com 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de curcumina.



Como forma de avaliar a recuperação da curcumina em diferentes matrizes, como no tampão contendo LSS, utilizado como meio receptor, e no extrato de mucosa, foram avaliados a taxa de recuperação do analíto pelo método de contaminação do padrão nas matrizes selecionadas. Os resultados estão expressos na tabela 5 e mostram que a taxa de recuperação da curcumina nas matrizes foi em torno de 100% e DPR foi menor do que 3%. Esses resultados indicam que a curcumina pode ser analisadas nessas matrizes, no ensaio de performance, sem prejuízo na sua detecção e quantificação, estando de acordo com a legislação (BRASIL, 2003).

Tabela 5. Valores da recuperação da curcumina nas matrizes estudadas, TP contendo LSS 0,5% e mucosa esofágica de suína, utilizando o método de adição do padrão.

Matriz	Concentração		DPR (%)	Recuperação (%)
	Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experimental ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
LSS 0,5% TP contendo	1,0	1,02 $\pm$ 0,03	2,94	102,0
	50,0	50,12 $\pm$ 0,11	0,22	100,2
	70,0	69,80 $\pm$ 0,09	0,13	99,7
mucosa Extrato de	1,0	1,08 $\pm$ 0,03	2,78	108,0
	50,0	50,10 $\pm$ 0,59	1,18	100,4
	70,0	71,00 $\pm$ 0,9	1,41	101,4

^a Média e desvio padrão

O método desenvolvido se mostrou linear, específico, preciso e exato para a determinação de curcumina em ensaio de performance, com na liberação e permeação, e também em ensaios de retenção em amostras biológicas, como na mucosa esofágica suína.

5.4.1 Avaliação da performance dos SPCL

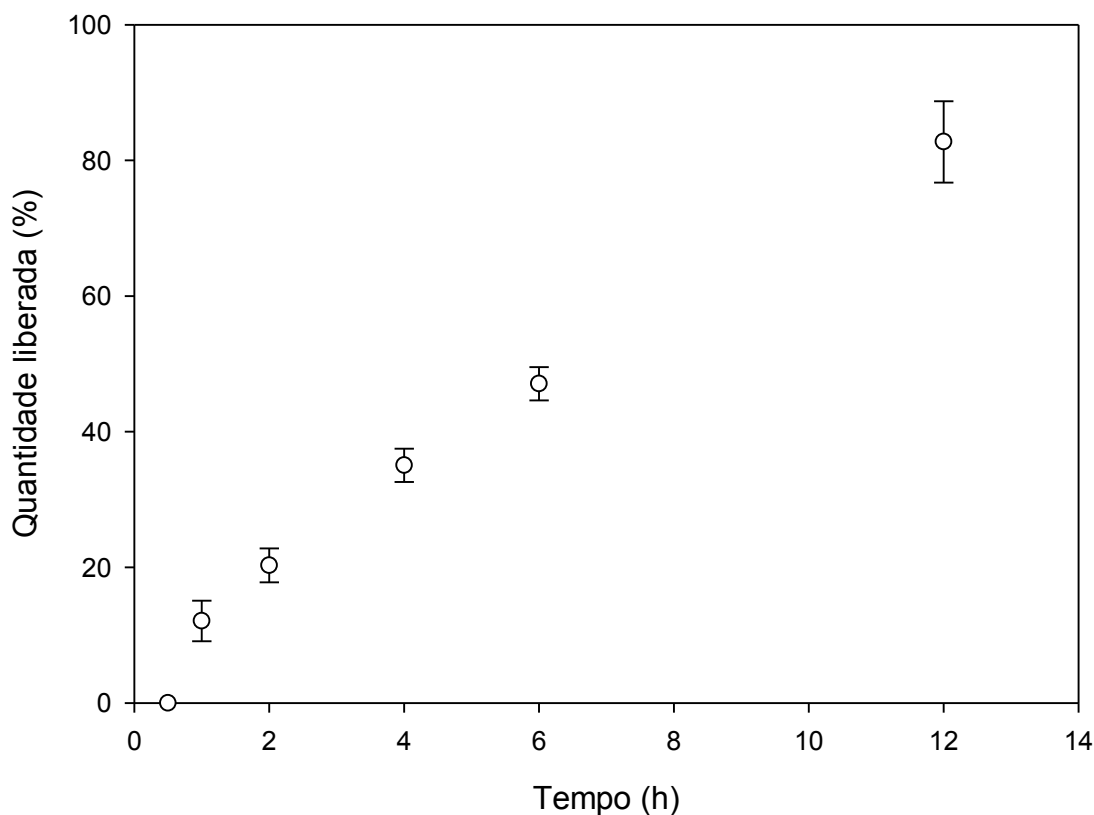
5.4.1.1 Ensaio de liberação *ex vivo*

Durante a fase de desenvolvimento de produtos farmacêuticos é adequado empregar procedimentos de liberação *in vitro* para selecionar formulações que possam proporcionar uma atividade terapêutica adequada. Pode-se considerar que os estudos de liberação medicamentosa proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os fármacos. Os estudos de liberação proporcionam dados que podem correlacionar com a estrutura do material e a capacidade deste em liberar os fármacos.

O estudo de liberação mostrou que o fármaco dissolvido em ácido oleico obteve uma liberação de aproximadamente 80% ao final de 12 horas, como mostrado no perfil de liberação (Figura 28). Porém, as formulações SPLC (F1QP e SP3) não foram capazes de liberar o fármaco através da membrana, ficando retido na forma farmacêutica. O comportamento de baixa ou nula taxa de liberação em

formas farmacêutica líquida-cristalinas foi evidenciado por outros autores, como por (FUJIMURA, 2014) que observou que a taxa de liberação foi baixa para o *trans*-resveratrol contido em sistemas de cristais líquidos hexagonais. O mesmo comportamento foi reportado por OYAFUSO (2012) com a incorporação de dexametasona em sistemas com mesofases hexagonais e cúbicas, que gerou uma liberação de 3% e 5%, respectivamente. CALIXTO (2013) também relatou a taxa de liberação nula, em sistemas lamelares e hexagonais, para um peptídeo análogo a adenosina de *Streptococcus mutans* incorporado em sistemas líquido-cristalinos com a finalidade da liberação bucal para tratamento e manejo de cárie dentária. A baixa taxa de liberação em sistemas líquido-cristalinos pode ser explicada por ocorrer uma forte interação do fármaco lipofílico, como, por exemplo, *trans*-resveratrol e dexametasona que possuem uma alta lipofilicidade, com os domínios fase oleosa e de tensoativo, fazendo com que o fármaco fique retido na forma farmacêutica.

Figura 28. Perfil de liberação (%) da curcumina dissolvida em ácido oleico pelo período de 12 horas.



Outro fato fator que possui influência na liberação é a organização estrutural de sistemas nanoestruturados de cristais líquidos. FARKAS, KISS & ZELKÓ (2007) relataram que o tipo de mesofase formada resulta em taxas mais lentas de liberação. Os autores observaram que a fase lamelar resulta em uma liberação do fármaco mais rápida e imediata do que quando incorporada em mesofases hexagonais.

Como não foi possível realizar a liberação das formulações F1QP e SP3, apenas foi possível ajustar aos modelos cinéticos a formulação controle. A liberação do fármaco a partir de sistemas de liberação modificada tem sido descrita por vários modelos cinéticos (COSTA, 2002). A interpretação quantitativa dos valores obtidos é preconizada pela utilização de uma equação genérica que traduza matematicamente a curva de liberação em função de parâmetros relacionados com as formas farmacêuticas.

Dos mais diversos modelos utilizados para estudar a cinética de liberação, estão os modelos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi. O modelo de primeira ordem descreve que a quantidade de fármaco é liberada proporcionalmente pela unidade de tempo e são ideais para formas farmacêuticas que tendem a veicular fármacos visando a liberação controlada (VARELAS, DIXON & STEINER, 1995).

O modelo de primeira ordem propõe que a liberação do fármaco ocorre de forma proporcional à quantidade de fármaco remanescente em seu interior, de modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002). A quantidade de fármaco liberada varia com a taxa apropriada, durante a análise.

A liberação de fármacos solúveis em água ou pouco solúveis em água a partir de sistemas semi-sólidos foi estudada por HIGUCHI (1962). O modelo de Higuchi pode ser melhor aplicado para formas farmacêuticas que não possuem propriedades de intumescimento (LOPES, LOBO & COSTA, 2005) e descreve que o mecanismo de liberação dos fármacos ocorre pelo processo de difusão, baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo (HIGUCHI, 1962).

Os resultados obtidos para a cinética de liberação mostraram a predominância da cinética de liberação do tipo de ordem zero, ou seja, a quantidade de fármaco liberada a partir da matriz é proporcional ao tempo. Modelos com um R^2 menor de 0,9 não devem ser aplicados, já que corresponde a um ajuste deficiente

do modelo. O modelo de Higuchi obteve um valor de R^2 de 0,8773 não sendo satisfatório.

Tabela 6. Constante (k) e coeficientes de regressão ajustado dos modelos aplicado ao ensaio de liberação da curcumina em ácido oleico.

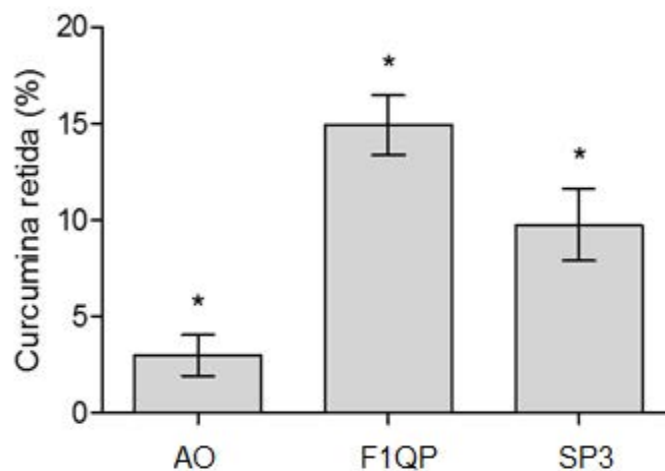
Modelo matemático	Constantes e coeficientes de regressão ajustado	
	K_0	R^2 ajustado
Ordem zero	6,7815	0,9790
	K_1	R^2
Primeira ordem	0,1180	0,9763
	K_H	R^2
Higuchi	20,1074	0,8773

Os modelos matemáticos são deduzidos por análises teóricas do processo de dissolução e liberação do fármaco em função do tempo, considerando a forma farmacêutica. Com o desenvolvimento de novos sistemas de liberação em que vários mecanismos de liberação podem estar envolvidos, fica difícil adequar fundamentos teóricos nas equações (COSTA & SOUSA LOBO, 2001).

5.4.1.2 Ensaio de permeação e retenção *ex vivo*

O ensaio de permeação não demonstrou que a curcumina possui capacidade de permear em 12 horas, entretanto a curcumina foi capaz de reter na mucosa. A figura 29 mostra a porcentagem acumulada no tecido de mucosa esofágica após 12 horas do teste *ex vivo*. A análise estatística mostrou que houve diferença entre as médias ($p > 0,05$) de porcentagem de retenção para as formulações. A retenção foi de aproximadamente 3%, 15% e 10% para o controle, F1QP e SP3.

Figura 29. Porcentagem de retenção de curcumina em mucosa suína após 12 horas do teste de liberação *ex vivo*.



Os valores de retenção mostraram valores superiores para F1QP, em relação à SP3 e para AO. Esses resultados foram maiores do que para o controle, já que o ácido oleico é relatado como um promotor de permeação e pode ter contribuído para promover a retenção.

Os tensoativos têm sido relatados na literatura como uma estratégia para aumentar o fluxo de fármaco permeando através das membranas biológicas (WILLIAMS & BARRY, 2012), além de aumentar a permeação de fármacos para via bucal (NICOLAZZO, REED & FINNIN, 2004; NICOLAZZO, REED & FINNIN, 2005; DU *et al.*, 2014).

O valor de retenção foi maior para sistemas lamelares do que para hexagonais e pode estar relacionado pela similaridade da estrutura lamelar líquido-cristalina com a membrana das células (LAGERWALL & SCALIA, 2012) que leva à uma maior interação promovendo a liberação no tecido alvo. Além disso, a liberação lenta e alta capacidade de carregamento de fármacos hidrofóbicos, como antitumorais, em sistemas líquido-cristalinos, é particularmente interessante para o tratamento do câncer, onde a citotoxicidade para fármacos antitumorais pode ser melhorada (LAGERWALL & SCALIA, 2012).

Embora a curcumina presente no sistema seja retida na mucosa, pode ser interessante para um efeito local sobre o câncer oral. Estudos adicionais devem ser realizados, de forma a avaliar a performance do sistema *in vitro* e estudos farmacocinéticos e de eficácia em animais, de forma para que possam contribuir para um desenvolvimento mais racional desses sistemas.

6 CONCLUSÃO

Os sistemas desenvolvidos se mostraram uma plataforma interessante para a aplicação na via bucal, já que foram mucoadesivos, sendo atraentes para aumento do tempo de residência da forma farmacêutica no sítio bucal. Os SPCLs mostram transição de fases em função da concentração de saliva artificial, e os parâmetros de textura foram superiores e crescentes, além da força de mucoadesão determinada. Embora, o fármaco não tenha liberado e nem permeado a partir da matriz, o fármaco foi capaz de ficar retido na mucosa esofágica, dependendo do tipo de mesofase formada, para as formulações estudadas.

REFERÊNCIAS

- ABHIRAMI, M.; BRINDHA, R.; GOMATHI, S.; VEDHA HARI, B. N.; RAMYA DEVI, D. Optimization of in-situ gelling system for nasal administration of celecoxib. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 2, p. 502-515, 2014.
- ADACHI, T.; ANDO, S.; WATANABE, J. Characterization of synthetic adsorbents with fine particle sizes for preparative-scale chromatographic separation. **Journal of Chromatography A**, v. 944, n. 1–2, p. 41-59, 2002.
- ADELSTEIN, D. J.; LI, Y.; ADAMS, G. L.; WAGNER, H., JR.; KISH, J. A.; ENSLEY, J. F.; SCHULLER, D. E.; FORASTIERE, A. A. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 1, p. 92-98, 2003.
- AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer Res**, v. 23, n. 1a, p. 363-398, 2003.
- AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1030, p. 434-441, 2004.
- _____. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 10, p. 1397-1421, 2006.
- AGGARWAL, S.; TAKADA, Y.; SINGH, S.; MYERS, J. N.; AGGARWAL, B. B. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. **Int J Cancer**, v. 111, n. 5, p. 679-692, 2004.
- AGUEROS, M.; RUIZ-GATON, L.; VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K.; ESPUELAS, S.; PONCHEL, G.; IRACHE, J. M. Combined hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and poly(anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. **Eur J Pharm Sci**, v. 38, n. 4, p. 405-413, 2009.
- ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807-818, 2007.
- ANAND, P.; SUNDARAM, C.; JHURANI, S.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. **Cancer Lett**, v. 267, n. 1, p. 133-164, 2008.
- ANSARI, M. J.; AHMAD, S.; KOHLI, K.; ALI, J.; KHAR, R. K. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 1–2, p. 132-138, 2005.

- AWAD, T. S.; OKAMOTO, Y.; MASUM, S. M.; YAMAZAKI, M. Formation of Cubic Phases from Large Unilamellar Vesicles of Dioleoylphosphatidylglycerol/Monoolein Membranes Induced by Low Concentrations of Ca^{2+} . **Langmuir**, v. 21, n. 25, p. 11556-11561, 2005.
- BACHAUD, J. M.; COHEN-JONATHAN, E.; ALZIEU, C.; DAVID, J. M.; SERRANO, E.; DALY-SCHVEITZER, N. Combined postoperative radiotherapy and weekly cisplatin infusion for locally advanced head and neck carcinoma: final report of a randomized trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 36, n. 5, p. 999-1004, 1996.
- BASELGA, J.; TRIGO, J. M.; BOURHIS, J.; TORTOCHAUX, J.; CORTES-FUNES, H.; HITT, R.; GASCON, P.; AMELLAL, N.; HARSTRICK, A.; ECKARDT, A. Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 24, p. 5568-5577, 2005.
- BEEVERS, C. S.; LI, F.; LIU, L.; HUANG, S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. **Int J Cancer**, v. 119, n. 4, p. 757-764, 2006.
- BEN-NERIAH, Y.; KARIN, M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. **Nat Immunol**, v. 12, n. 8, p. 715-723, 2011.
- BERNEGOSI, 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.
- BHARDWAJ, V.; KUMAR, M. N. V. R. Drug Delivery Systems to Fight Cancer. In: SIEPMANN, J.; SIEGEL, R. A.; RATHBONE, M. J. **Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery**. New York: Springer, 2012. p.493-516. (Advances in Delivery Science and Technology).
- BINDHU, O. S.; RAMADAS, K.; SEBASTIAN, P.; PILLAI, M. R. High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 28, n. 10, p. 916-925, 2006.
- BIRUDARAJ, R.; BERNER, B.; SHEN, S.; LI, X. Buccal permeation of buspirone: Mechanistic studies on transport pathways. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 1, p. 70-78, 2005.
- BODDUPALLI, B. M.; MOHAMMED, Z. N.; NATH, R. A.; BANJI, D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **J Adv Pharm Technol Res**, v. 1, n. 4, p. 381-387, 2010.
- BONNER, J. A.; HARARI, P. M.; GIRALT, J.; AZARNIA, N.; SHIN, D. M.; COHEN, R. B.; JONES, C. U.; SUR, R.; RABEN, D.; JASSEM, J.; OVE, R.; KIES, M. S.; BASELGA, J.; YOUSSEF, H.; AMELLAL, N.; ROWINSKY, E. K.; ANG, K. K.

Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 6, p. 567-578, 2006.

BOURNE, M.; SZCZESNIAK, A. S. Issues pertaining to the texture profile analysis. **Journal of Texture Studies**, v. 29, n. 4, p. 7-8, 1998.

BOYD, B. J.; WHITTAKER, D. V.; KHOO, S. M.; DAVEY, G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **Int J Pharm**, v. 309, n. 1-2, p. 218-226, 2006.

BRADWAY, S. D.; BERGEY, E. J.; JONES, P. C.; LEVINE, M. J. Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. **Biochem J**, v. 261, n. 3, p. 887-896, 1989.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 19 de março de 2003. 2003

BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; FARABOLLINI, A.; PALMIERI, G. F.; PONCHEL, G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **Biomaterials**, v. 28, n. 13, p. 2233-2243, 2007.

BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O. Oral bioadhesive drug delivery systems. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 31, n. 3, p. 293-310, 2005.

BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H.; PANZERI, H.; GREMIAO, M. P.; JONES, D. S. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: development and characterization. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 34, n. 3, p. 267-278, 2008.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H. G. 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.

BURSCH, W.; ELLINGER, A.; GERNER, C.; FROHWEIN, U.; SCHULTE-HERMANN, R. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? **Ann N Y Acad Sci**, v. 926, p. 1-12, 2000.

CALIXTO, G.; YOSHII, A. C.; ROCHA E SILVA, H.; STRINGHETTI FERREIRA CURY, B.; CHORILLI, M. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. **Pharmaceutical Development and Technology**, p. 1-7, 2014.

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.

CALLENS, C.; CEULEMANS, J.; LUDWIG, A.; FOREMAN, P.; REMON, J. P. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 323-328, 2003.

CAON, T.; PAN, Y.; SIMÕES, C. M. O.; NICOLAZZO, J. A. Exploiting the Buccal Mucosa as an Alternative Route for the Delivery of Donepezil Hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 6, p. 1643-1651, 2014.

CARVALHO, F. C. **Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina**. 2012. 163 f. Tese (Doutor em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CARVALHO, F. C.; BARBI, M. S.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; NETTO, F. M.; GREMIÃO, M. P. D. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 430-439, 2010a.

CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 1-17, 2010b.

CARVALHO, F. C.; CALIXTO, G.; HATAKEYAMA, I. N.; LUZ, G. M.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, 2012.

CARVALHO, F. C.; CAMPOS, M. L.; PECCININI, R. G.; GREMIAO, M. P. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 84, n. 1, p. 219-227, 2013.

CARVALHO, F. C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M. P. D. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos - propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros**, v. 24, p. 203-213, 2014.

CARVALHO, F. C.; SARMENTO, V. H. V.; CHIAVACCI, L. A.; BARBI, M. S.; GREMIÃO, M. P. D. Development and in vitro evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 5, p. 2367-2374, 2010c.

CASTILE, J. D.; TAYLOR, K. M. G.; BUCKTON, G. The influence of incubation temperature and surfactant concentration on the interaction between dimyristoylphosphatidylcholine liposomes and poloxamer surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1-2, p. 197-209, 2001.

- CATIMEL, G.; VERWEIJ, J.; MATTIJSEN, V.; HANAUSKE, A.; PICCART, M.; WANDERS, J.; FRANKLIN, H.; LE BAIL, N.; CLAVEL, M.; KAYE, S. B. Docetaxel (Taxotere): an active drug for the treatment of patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. EORTC Early Clinical Trials Group. **Ann Oncol**, v. 5, n. 6, p. 533-537, 1994.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 689, n. 1, p. 175-180, 1997.
- CHANG, J. Y.; OH, Y.-K.; CHOI, H.-G.; KIM, Y. B.; KIM, C.-K. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, n. 1, p. 155-163, 2002.
- CHEN, C. J.; YOU, S. L.; LIN, L. H.; HSU, W. L.; YANG, Y. W. Cancer epidemiology and control in Taiwan: a brief review. **Jpn J Clin Oncol**, v. 32 Suppl, p. S66-81, 2002.
- CHITAPANARUX, I.; LORVIDHAYA, V.; SITTITRAI, P.; PATTARASAKULCHAI, T.; THARAVICHITKUL, E.; SRIUTHAISIRIWONG, P.; KAMNERDSUPAPHON, P.; SUKTHOMYA, V. Oral cavity cancers at a young age: analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. **Oral Oncol**, v. 42, n. 1, p. 83-88, 2006.
- CIVILLE, G. V.; SZCZESNIAK, A. S. Guidelines to training a texture profile panel **Journal of Texture Studies**, v. 4, n. 2, p. 204-223, 1973.
- CLAVEL, M.; VERMORKEN, J. B.; COGNETTI, F.; CAPPELAERE, P.; MULDER, P. H. M. D.; SCHORNAGEL, J. H.; TUENI, E. A.; VERWEIJ, J.; WILDIERS, J.; CLERICO, M.; DALESIO, O.; KIRKPATRICK, A.; SNOW, G. B. Randomized comparison of cisplatin, methotrexate, bleomycin and vincristine (CABO) versus cisplatin and 5-fluorouracil (CF) versus cisplatin (C) in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: A phase III study of the EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. **Annals of Oncology**, v. 5, n. 6, p. 521-526, 1994.
- COLLINS, L. M.; DAWES, C. The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. **Journal of Dental Research**, v. 66, n. 8, p. 1300-1302, 1987.
- COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.
- COSTA, P. J. C. D. Avaliação in vitro da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 141-153, 2002.
- CREMONEZ, C. P.; BENTLEY, M. V. L. B.; LARA, M. G. Characterization of swelling of lamellar phases of monoolein and water containing polyhexamethylene biguanide.

Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada, v. 34, n. 4, p. 545-553, 2013.

CSIKAR, J.; ARAVANI, A.; GODSON, J.; DAY, M.; WILKINSON, J. Incidence of oral cancer among South Asians and those of other ethnic groups by sex in West Yorkshire and England, 2001-2006. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 51, n. 1, p. 25-29, 2013.

DE ROSA, I.; STAIBANO, S.; LO MUZIO, L.; DELFINO, M.; LUCARIELLO, A.; COPPOLA, A.; DE ROSA, G.; SCULLY, C. Potentially malignant and malignant lesions of the lip. Role of silver staining nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-myc in differentiation and prognosis. **J Oral Pathol Med**, v. 28, n. 6, p. 252-258, 1999.

DERJAGUIN, B. V.; ALENIKOVA, I. N.; TOPOROV, Y. P. On the role of electrostatic forces in the adhesion of polymer particles to solid surfaces. **Progress in Surface Science**, v. 45, n. 1-4, p. 119-123, 1994.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **J Pharm Sci**, v. 96, n. 10, p. 2547-2565, 2007.

DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; SINHA, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. e67, 2004.

DONNIO, B.; BUATHONG, S.; BURY, I.; GUILLON, D. Liquid crystalline dendrimers. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 9, p. 1495-1513, 2007.

DU, J. D.; LIU, Q.; SALENTINIG, S.; NGUYEN, T.-H.; BOYD, B. J. A novel approach to enhance the mucoadhesion of lipid drug nanocarriers for improved drug delivery to the buccal mucosa. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p. 358-365, 2014.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharm Res**, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

ELATTAR, T. M. A.; VIRJI, A. S. The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells in vitro. **Anticancer Research**, v. 20, n. 3 A, p. 1733-1738, 2000.

EPSTEIN, J. B.; SILVERMAN, S., JR.; EPSTEIN, J. D.; LONKY, S. A.; BRIDE, M. A. Analysis of oral lesion biopsies identified and evaluated by visual examination, chemiluminescence and toluidine blue. **Oral Oncol**, v. 44, n. 6, p. 538-544, 2008.

EPSTEIN, J. B.; ZHANG, L.; ROSIN, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **J Can Dent Assoc**, v. 68, n. 10, p. 617-621, 2002.

FAHR, A.; LIU, X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 4, n. 4, p. 403-416, 2007.

FARKAS, E.; KISS, D.; ZELKÓ, R. Study on the release of chlorhexidine base and salts from different liquid crystalline structures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 340, n. 1-2, p. 71-75, 2007.

FARNAUD, S. J. C.; KOSTI, O.; GETTING, S. J.; RENSHAW, D. Saliva: Physiology and diagnostic potential in health and disease. **TheScientificWorldJournal**, v. 10, p. 434-456, 2010.

FEHÉR, A.; ERÖS, E. C.; I. In situ forming lyotropic liquid crystalline systems containing metronidazole-benzoate. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 15, n. 5, p. 343-346, 2005.

FIROUZI, Z.; LARI, P.; RASHEDINIA, M.; RAMEZANI, M.; IRANSHAHI, M.; ABNOUS, K. Proteomics screening of molecular targets of curcumin in mouse brain. **Life Sciences**, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2014.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical Principles of Pharmacy**. London: Pharmaceutical Press, 2006. 492 p.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A. D.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. D. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 301-313, 2005.

FUJIMURA, A. T. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos para incorporação do trans-resveratrol: ensaios de permeação cutânea in vitro e avaliação da eficácia in vivo**. 2014. 00 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

GABBOUN, N. H.; NAJIB, N. M.; IBRAHIM, H. G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid, diclofenac 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.

GANDHI, R. B.; ROBINSON, J. R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 13, n. 1-2, p. 43-74, 1994.

GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; FALSON-RIEG, F.; BURI, P. Ex vivo oral mucosal permeation of lidocaine hydrochloride with sucrose fatty acid esters as absorption enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 173, n. 1-2, p. 203-210, 1998.

GARG, A.; AGGARWAL, B. B. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. **Leukemia**, v. 16, n. 6, p. 1053-1068, 2002.

- GHOSH, T. K.; PFISTER, W. R. **Drug delivery to the oral cavity: molecules to market**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. 307 p.
- GILHOTRA, R. M.; IKRAM, M.; SRIVASTAVA, S.; GILHOTRA, N. A clinical perspective on mucoadhesive buccal drug delivery systems. **J Biomed Res**, v. 28, n. 2, p. 81-97, 2014.
- GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 4, p. 787-809, 2008.
- GOKCE, E. H.; OZYAZICI, M.; SOUTO, E. B. Nanoparticulate strategies for effective delivery of poorly soluble therapeutics. **Ther Deliv**, v. 1, n. 1, p. 149-167, 2010.
- GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 11, p. 1713-1723, 2005.
- GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; ROCHA, E. M.; SARMENTO, V. H.; DE FREITAS, O.; LOPEZ, R. F. V. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 186-193, 2010.
- GUPTA, S. C.; KIM, J. H.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. **Cancer Metastasis Rev**, v. 29, n. 3, p. 405-434, 2010.
- HADDAD, R.; SONIS, S.; POSNER, M.; WIRTH, L.; COSTELLO, R.; BRASCHAYKO, P.; ALLEN, A.; MAHADEVAN, A.; FLYNN, J.; BURKE, E.; LI, Y.; TISHLER, R. B. Randomized phase 2 study of concomitant chemoradiotherapy using weekly carboplatin/paclitaxel with or without daily subcutaneous amifostine in patients with locally advanced head and neck cancer. **Cancer**, v. 115, n. 19, p. 4514-4523, 2009.
- HAFKAMP, H. C.; SPEEL, E. J.; HAESEVOETS, A.; BOT, F. J.; DINJENS, W. N.; RAMAEKERS, F. C.; HOPMAN, A. H.; MANNI, J. J. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. **Int J Cancer**, v. 107, n. 3, p. 394-400, 2003.
- HÄGERSTRÖM, H.; EDSMAN, K.; STRØMME, M. Low-frequency dielectric spectroscopy as a tool for studying the compatibility between pharmaceutical gels and mucous tissue. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 9, p. 1869-1881, 2003.
- HAM-PICHAVANT, F.; SÈBE, G.; PARDON, P.; COMA, V. Fat resistance properties of chitosan-based paper packaging for food applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 3, p. 259-265, 2005.

- HARRIS, D.; ROBINSON, J. R. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 1, p. 1-10, 1992.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.
- HE, C.; HU, Y.; YIN, L.; TANG, C.; YIN, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657-3666, 2010.
- HEARNDEN, V.; SANKAR, V.; HULL, K.; JURAS, D. V.; GREENBERG, M.; KERR, A. R.; LOCKHART, P. B.; PATTON, L. L.; PORTER, S.; THORNHILL, M. H. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 1, p. 16-28, 2012.
- HIGUCHI, W. I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 51, p. 802-804, 1962.
- HOLGADO, M. A.; MARTIN-BANDERAS, L.; ALVAREZ-FUENTES, J.; FERNANDEZ-AREVALO, M.; ARIAS, J. L. Drug targeting to cancer by nanoparticles surface functionalized with special biomolecules. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 19, p. 3188-3195, 2012.
- HULLMANN, M. M.; REICHERT, T. E. Aktuelle Konzepte zur Früherkennung, Diagnostik und Therapie oraler Plattenepithelkarzinome. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, v. 54, n. 9, p. 1083-1088, 2011.
- HYDE, S. T. Identification of Lyotropic Liquid Crystalline Mesophases. In: HOLMBERG, K. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: Wiley, v.2, 2002. p.299-332.
- ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures**. Text and Methodology. International Conference on Harmonisation. 2005
- INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2014. p.
- ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and Surfaces Forces**. 2. New York: Academic, 1991. p.
- 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.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

- JONES, D. S.; BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O.; GREMIÃO, M. P. D.; LARA, E. H. G.; ANDREWS, G. P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, n. 1–2, p. 49-58, 2009.
- 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.
- _____. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, n. 2, p. 223-233, 1997b.
- JOSEPH, B. K. Oral cancer: prevention and detection. **Med Princ Pract**, v. 11 Suppl 1, p. 32-35, 2002.
- KAMINAGAKURA, E.; VILLA, L. L.; ANDREOLI, M. A.; SOBRINHO, J. S.; VARTANIAN, J. G.; SOARES, F. A.; NISHIMOTO, I. N.; ROCHA, R.; KOWALSKI, L. P. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Int J Cancer**, v. 130, n. 8, p. 1726-1732, 2012.
- KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 431-436, 2006.
- KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 6, p. 748-764, 2011.
- KIM, J. Y.; CHO, T. J.; WOO, B. H.; CHOI, K. U.; LEE, C. H.; RYU, M. H.; PARK, H. R. Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells. **Archives of Oral Biology**, v. 57, n. 8, p. 1018-1025, 2012.
- KOCH, F. P.; KAEMMERER, P. W.; BIESTERFELD, S.; KUNKEL, M.; WAGNER, W. Effectiveness of autofluorescence to identify suspicious oral lesions--a prospective, blinded clinical trial. **Clin Oral Investig**, v. 15, n. 6, p. 975-982, 2011.
- KOCKISCH, S.; REES, G. D.; YOUNG, S. A.; TSIBOUKLIS, J.; SMART, J. D. A direct-staining method to evaluate the mucoadhesion of polymers from aqueous dispersion. **Journal of Controlled Release**, v. 77, n. 1–2, p. 1-6, 2001.
- KRAAN, H.; VRIELING, H.; CZERKINSKY, C.; JISKOOT, W.; KERSTEN, G.; AMORIJ, J.-P. Buccal and sublingual vaccine delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 190, n. 0, p. 580-592, 2014.
- KRUIJTZER, C. M.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: an overview. **Oncologist**, v. 7, n. 6, p. 516-530, 2002.

- LAFFLEUR, F. Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 5, p. 591-598, 2014.
- LAGERWALL, J. P. F.; SCALIA, G. A new era for liquid crystal research: Applications of liquid crystals in soft matter nano-, bio- and microtechnology. **Current Applied Physics**, v. 12, n. 6, p. 1387-1412, 2012.
- LARSSON, K. Cubic lipid-water phases: structures and biomembrane aspects. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 93, n. 21, p. 7304-7314, 1989.
- LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. **Food Research International**, v. 33, n. 8, p. 665-671, 2000.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supplement, n. 0, p. 175-193, 2012.
- LEE, J.; KELLAWAY, I. W. Combined effect of oleic acid and polyethylene glycol 200 on buccal permeation of [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin from a cubic phase of glyceryl monooleate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 204, n. 1-2, p. 137-144, 2000.
- _____. Peptide Washout and Permeability from Glyceryl Monooleate Buccal Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 9, p. 1155-1162, 2002.
- LEE, J.; YOUNG, S. A.; KELLAWAY, I. W. Water quantitatively induces the mucoadhesion of liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. **J Pharm Pharmacol**, v. 53, n. 5, p. 629-636, 2001.
- LEUNG, S.-H. S.; ROBINSON, J. R. Polymer structure features contributing to mucoadhesion. II. **Journal of Controlled Release**, v. 12, n. 3, p. 187-194, 1990.
- LI, S.; POLLOCK-DOVE, C.; DONG, L. C.; CHEN, J.; CREASEY, A. A.; DAI, W.-G. Enhanced Bioavailability of a Poorly Water-Soluble Weakly Basic Compound Using a Combination Approach of Solubilization Agents and Precipitation Inhibitors: A Case Study. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 5, p. 1100-1108, 2012.
- LIAO, S.; XIA, J.; CHEN, Z.; ZHANG, S.; AHMAD, A.; MIELE, L.; SARKAR, F. H.; WANG, Z. Inhibitory effect of curcumin on oral carcinoma CAL-27 cells via suppression of notch-1 and NF-κB signaling pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 4, p. 1055-1065, 2011.
- LIN, Y. W.; LI, C. F.; CHEN, H. Y.; YEN, C. Y.; LIN, L. C.; HUANG, C. C.; HUANG, H. Y.; WU, P. C.; CHEN, C. H.; CHEN, S. C.; TAI, M. H. The expression and prognostic significance of hepatoma-derived growth factor in oral cancer. **Oral Oncol**, v. 48, n. 7, p. 629-635, 2012.
- LITWINIENKO, G.; INGOLD, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of

sequential proton loss electron transfer. **J Org Chem**, v. 69, n. 18, p. 5888-5896, 2004.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 147-155, 2004.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **J Oral Pathol Med**, v. 33, n. 9, p. 525-532, 2004.

LONGO, J. P. F.; LOZZI, S. P.; AZEVEDO, R. B. Oral cancer and photodynamic therapy as a treatment **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 59, p. 51-57, 2011.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 143-154, 2005.

LOPES, L.; FERREIRA, D.; DE PAULA, D.; GARCIA, M. T.; THOMAZINI, J.; FANTINI, M. A.; BENTLEY, M. V. B. 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.

LUCERO, M. J.; VIGO, J.; LEÓN, M. J. A study of shear and compression deformations on hydrophilic gels of tretinoin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 106, n. 2, p. 125-133, 1994.

MADHAV, N. V. S.; SHAKYA, A. K.; SHAKYA, P.; SINGH, K. Orotransmucosal drug delivery systems: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 140, n. 1, p. 2-11, 2009.

MAHALINGAM, R.; RAVIVARAPU, H.; REDKAR, S.; LI, X.; JASTI, B. R. Transbuccal delivery of 5-aza-2'-deoxycytidine: effects of drug concentration, buffer solution, and bile salts on permeation. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 3, p. E55, 2007.

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

_____. Phase Transformations in Self-Assembly Systems for Drug Delivery Applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 63-72, 2007.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Braz. J. Pharm. Sci**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

- MATHIOWITZ, E.; CHICKERING, D. E.; LEHR, C. M. **Bioadhesive drug delivery systems: fundamentals, novel approaches, and development**. New York: Marcel Dekker, 1999. 696 p.
- MAZZARINO, L.; LOCH-NECKEL, G.; BUBNIAK, L. D. S.; MAZZUCCO, S.; SANTOS-SILVA, M. C.; BORSALI, R.; LEMOS-SENNA, E. Curcumin-Loaded Chitosan-Coated Nanoparticles as a New Approach for the Local Treatment of Oral Cavity Cancer. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 781-791, 2015.
- MEZZENGA, R. Physics of Self-Assembly of Lyotropic Liquid Crystals. In: GARTI, N.; SOMASUNDARAN, P. ; MEZZENGA, R. **Self-assembled supramolecular architectures : lyotropic liquid crystals**. Hoboken: Wiley, 2012. p.1-20.
- MORISHITA, M.; BARICHELLO, J. M.; TAKAYAMA, K.; CHIBA, Y.; TOKIWA, S.; NAGAI, T. Pluronic® F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, n. 2, p. 289-293, 2001.
- MORISHITA, M.; PARK, K. **Biodrug Delivery Systems: Fundamentals, Applications and Clinical Development**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 451 p.
- MURPHY, F.; MIDDLETON, M. 45 - Cytostatic and cytotoxic drugs. In: ARONSON, J. K. **Side Effects of Drugs Annual**: Elsevier, v. Volume 34, 2012. p.731-747. ISBN 0378-6080.
- NAKAMOTO, R. Y. Use of a saliva substitute in postradiation xerostomia. **J Prosthet Dent**, v. 42, n. 5, p. 539-542, 1979.
- NAKANO, M.; TESHIGAWARA, T.; SUGITA, A.; LEESAJAKUL, W.; TANIGUCHI, A.; KAMO, T.; MATSUOKA, H.; HANDA, T. Dispersions of Liquid Crystalline Phases of the Monoolein/Oleic Acid/Pluronic F127 System. **Langmuir**, v. 18, n. 24, p. 9283-9288, 2002.
- NICOLAZZO, J. A.; REED, B. L.; FINNIN, B. C. Assessment of the effects of sodium dodecyl sulfate on the buccal permeability of caffeine and estradiol. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 2, p. 431-440, 2004.
- _____. Buccal penetration enhancers—How do they really work? **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 1–2, p. 1-15, 2005.
- NIELSEN, L. S.; SCHUBERT, L.; HANSEN, J. Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl mono-oleate and glyceryl monolinoleate. **Eur J Pharm Sci**, v. 6, n. 3, p. 231-239, 1998.
- NISHINARI, K.; KOHYAMA, K.; KUMAGAI, H.; FUNAMI, T.; BOURNE, M. C. Parameters of Texture Profile Analysis. **Food Science and Technology Research**, v. 19, n. 3, p. 519-521, 2013.

OH, D.-H.; CHUN, K.-H.; JEON, S.-O.; KANG, J.-W.; LEE, S. Enhanced transbuccal salmon calcitonin (sCT) delivery: Effect of chemical enhancers and electrical assistance on in vitro sCT buccal permeation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 357-363, 2011.

OKAMOTO, Y.; MASUM, S. M.; MIYAZAWA, H.; YAMAZAKI, M. Low-pH-Induced Transformation of Bilayer Membrane into Bicontinuous Cubic Phase in Dioleoylphosphatidylserine/Monoolein Membranes. **Langmuir**, v. 24, n. 7, p. 3400-3406, 2008.

ONOFRE, M. A.; SPOSTO, M. R.; NAVARRO, C. M.; MOTTA, M. E.; TURATTI, E.; ALMEIDA, R. T. Potentially malignant epithelial oral lesions: discrepancies between clinical and histological diagnosis. **Oral Dis**, v. 3, n. 3, p. 148-152, 1997.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.

OYAFUSO, M. H. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas micro e nanoestruturados para a administração cutânea de acetato de dexametasona**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

OYAFUSO, M. H.; CARVALHO, F. C.; CHIAVACCI, L. A.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. 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.

PADERNI, C.; COMPILATO, D.; GIANNOLA, L. I.; CAMPISI, G. Oral local drug delivery and new perspectives in oral drug formulation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 114, n. 3, p. e25-e34, 2012.

PAN, M. H.; HUANG, T. M.; LIN, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metab Dispos**, v. 27, n. 4, p. 486-494, 1999.

PATEL, D.; PATEL, D.; PRAJAPATI, J.; PATEL, U.; PATEL, V. Formulation of thermoresponsive and buccal adhesive in situ gel for treatment of oral thrush containing poorly water soluble drug biconazole. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, n. SUPPL., p. 116-117, 2012.

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.; LIU, F.; BROWN, M. B. Advances in oral transmucosal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 106-116, 2011.

_____. Modeling the oral cavity: In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 746-756, 2012.

- PAYTON, F.; SANDUSKY, P.; ALWORTH, W. L. NMR Study of the Solution Structure of Curcumin. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 143-146, 2007.
- PENDEKAL, M. S.; TEGGINAMAT, P. K. Development and characterization of chitosan-polycarbophil interpolyelectrolyte complex-based 5-fluorouracil formulations for buccal, vaginal and rectal application. **Daru**, v. 20, n. 1, p. 67, 2012.
- PONCHEL, G.; MONTISCI, M. J.; DEMBRI, A.; DURRER, C.; DUCHÊNE, D. Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 44, n. 1, p. 25-31, 1997.
- QIU, H.; CAFFREY, M. The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects. **Biomaterials**, v. 21, n. 3, p. 223-234, 2000.
- RAGIN, C. C.; TAIOLI, E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. **Int J Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1813-1820, 2007.
- RAI, V.; TAN, H. S.; MICHNIAK-KOHN, B. Effect of surfactants and pH on naltrexone (NTX) permeation across buccal mucosa. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1-2, p. 92-97, 2011.
- RAI, V. K.; YADAV, N. P.; SINHA, P.; MISHRA, N.; LUQMAN, S.; DWIVEDI, H.; KYMONIL, K. M.; SARAF, S. A. Development of cellulosic polymer based gel of novel ternary mixture of miconazole nitrate for buccal delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 126-133, 2014.
- RATHI, A. A.; DHAMECHA, D. L.; PATEL, K. A.; SAIFEE, M.; DEHGHAN, M. H. G. Effect of Permeation Enhancers on Permeation Kinetics of Idebenone through the Bovine Buccal Mucosa. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, n. 4, p. 2-5, 2011.
- RAVINDRANATH, V.; CHANDRASEKHARA, N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. **Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 259-265, 1980.
- RAVINDRANATH, V.; CHANDRASEKHARA, N. Metabolism of curcumin-studies with [3H]curcumin. **Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 337-344, 1981.
- REINITZER, F. Beiträge zur Kenntniss des Cholesterins. **Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften**, v. 9, n. 1, p. 421-441, 1888.
- 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.
- RICHMOND, A. NF-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 9, p. 664-674, 2002.

- SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E.; WATZKE, H. J.; MICHEL, M. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 204-214, 2006.
- SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1666-1691, 2005.
- SANDRI, G.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M. C.; MUZZARELLI, C.; CAMELLA, C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 2-3, p. 351-359, 2004.
- SATTAR, M.; SAYED, O. M.; LANE, M. E. Oral transmucosal drug delivery – Current status and future prospects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p. 498-506, 2014.
- SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H. B. Rheological properties of binary and ternary protein-polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 263-270, 2011.
- ŞENEL, S.; HİNCAL, A. A. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. **Journal of Controlled Release**, v. 72, n. 1-3, p. 133-144, 2001.
- SETHI, G.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 233, n. 1, p. 21-31, 2008.
- SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 229-250, 2001.
- SHAH, J. P.; LYDIATT, W. Treatment of cancer of the head and neck. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 45, n. 6, p. 352-368, 1995.
- SHARMA, C.; KAUR, J.; SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B. B.; RALHAN, R. Curcumin down regulates smokeless tobacco-induced NF- κ B activation and COX-2 expression in human oral premalignant and cancer cells. **Toxicology**, v. 228, n. 1, p. 1-15, 2006.
- SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1955-1968, 2005.
- SHARMA, R. A.; STEWARD, W. P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. In: AGGARWAL, B. B.; SURH, Y.-J.; SHINODIA, S. **The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease**. New York: Springer, 2007. p.453-470.

- SHILEDAR, R. R.; TAGALPALLEWAR, A. A.; KOKARE, C. R. Formulation and in vitro evaluation of xanthan gum-based bilayered mucoadhesive buccal patches of zolmitriptan. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 0, p. 1234-1242, 2014.
- SHIN, S.-C.; KIM, J.-Y. Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the buccal mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 2, p. 217-220, 2000.
- SHISHODIA, S.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Role of curcumin in cancer therapy. **Curr Probl Cancer**, v. 31, n. 4, p. 243-305, 2007.
- SHISHODIA, S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin: getting back to the roots. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1056, p. 206-217, 2005.
- SHOJAEI, A. H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. **J Pharm Pharm Sci**, v. 1, n. 1, p. 15-30, 1998.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.
- SILVA, H.; LUZ, G.; SATAKE, C.; CORREA, B.; SARMENTO, V. Surfactant-based Transdermal System for Fluconazole Skin Delivery. **J Nanomed Nanotechnol**, v. 5, n. 231, p. 2, 2014.
- SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reports**, v. 324, n. 2-4, p. 107-269, 2000.
- SLOMIANY, B. L.; MURTY, V. L. N.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. Salivary mucins in oral mucosal defense. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, n. 5, p. 761-771, 1996.
- SLOMIANY, B. L.; PIOTROWSKI, J.; MAJKA, J.; LIAU, Y. H.; SLOMIANY, A. Identification of buccal mucosal mucin receptor. **Biochem Mol Biol Int**, v. 31, n. 6, p. 1091-1099, 1993.
- SMART, J. D. Lectin-mediated drug delivery in the oral cavity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 481-489, 2004.
- _____. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005a.
- _____. Buccal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 3, p. 507-517, 2005b.
- _____. Chemical Enhancers in Buccal and Sublingual Absorptions. In: TOUITOU, E. ; BARRY, B. W. **Enhancement in Drug Delivery**. Boca Raton: CRC Press, 2011. p.203-214.

- SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Why is Chitosan Mucoadhesive? **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1837-1842, 2008.
- SONI, S. S.; BROTONS, G.; BELLOUR, M.; NARAYANAN, T.; GIBAUD, A. Quantitative SAXS Analysis of the P123/Water/Ethanol Ternary Phase Diagram. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 31, p. 15157-15165, 2006.
- SOUZA, C.; WATANABE, E.; BORGHETI-CARDOSO, L. N.; DE FANTINI, M. C. A.; LARA, M. G. Mucoadhesive system formed by liquid crystals for buccal administration of poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 12, p. 3914-3923, 2014.
- SQUIER, C. A.; KREMER, M. J. Biology of Oral Mucosa and Esophagus. **JNCI Monographs**, v. 2001, n. 29, p. 7-15, 2001.
- STEELE, T. O.; MEYERS, A. Early detection of premalignant lesions and oral cancer. **Otolaryngol Clin North Am**, v. 44, n. 1, p. 221-229, vii, 2011.
- SU, C. C.; YANG, H. F.; HUANG, S. J.; LIAN IE, B. Distinctive features of oral cancer in Changhua County: high incidence, buccal mucosa preponderance, and a close relation to betel quid chewing habit. **J Formos Med Assoc**, v. 106, n. 3, p. 225-233, 2007.
- SUNG, B.; PRASAD, S.; YADAV, V. R.; AGGARWAL, B. B. Cancer Cell Signaling Pathways Targeted by Spice-Derived Nutraceuticals. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 2, p. 173-197, 2011.
- SWARNAKAR, N.; JAIN, V.; DUBEY, V.; MISHRA, D.; JAIN, N. K. Enhanced Oromucosal Delivery of Progesterone Via Hexosomes. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, p. 2223-2230, 2007.
- TABAK, L. A.; LEVINE, M. J.; MANDEL, I. D.; ELLISON, S. A. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 1982.
- TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1583-1594, 2005.
- TERWOGT, J. M.; SCHELLENS, J. H.; HUININK, W. W.; BEIJNEN, J. H. Clinical pharmacology of anticancer agents in relation to formulations and administration routes. **Cancer Treat Rev**, v. 25, n. 2, p. 83-101, 1999.
- TORRES-PEREIRA, C. C.; ANGELIM-DIAS, A.; MELO, N. S.; LEMOS JR, C. A.; OLIVEIRA, E. M. F. D. Abordagem do câncer da boca: uma estratégia para os níveis primário e secundário de atenção em saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, p. s30-s39, 2012.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. **Cell Death Differ**, v. 12 Suppl 2, p. 1528-1534, 2005.

TURUNEN, T. M.; URTTI, A.; PARONEN, P.; AUDUS, K.; RYTTING, J. H. Effect of Some Penetration Enhancers on Epithelial Membrane Lipid Domains: Evidence from Fluorescence Spectroscopy Studies. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 288-294, 1994.

URBAN, M. C. C.; LANDGRAF, D. S.; OYAFUSO, M. H.; CHIAVACCI, L. A.; SARMENTO, V. H. V.; CHORILLI, M.; CORRÊA, M. A.; GREMIÃO, M. P. D. Development and *In Vitro* Skin Delivery of Dexamethasone Acetate-Loaded Surfactant-Based Systems. **Journal of Nanopharmaceutics and Drug Delivery**, v. 1, n. 3, p. 323-334, 2013.

USUI, F.; MAEDA, K.; KUSAI, A.; NISHIMURA, K.; KEIJI, Y. Inhibitory effects of water-soluble polymers on precipitation of RS-8359. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, n. 1, p. 59-66, 1997.

VARELAS, C. G.; DIXON, D. G.; STEINER, C. A. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. **Journal of Controlled Release**, v. 34, n. 3, p. 185-192, 1995.

VARGAS, M.; ALBORS, A.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 536-547, 2009.

VERMORKEN, J. B.; MESIA, R.; RIVERA, F.; REMENAR, E.; KAWECKI, A.; ROTTEY, S.; ERFAN, J.; ZABOLOTNYY, D.; KIENZER, H.-R.; CUISSOL, D.; PEYRADE, F.; BENASSO, M.; VYNNYCHENKO, I.; DE RAUCOURT, D.; BOKEMEYER, C.; SCHUELER, A.; AMELLAL, N.; HITT, R. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 11, p. 1116-1127, 2008.

VERMORKEN, J. B.; TRIGO, J.; HITT, R.; KORALEWSKI, P.; DIAZ-RUBIO, E.; ROLLAND, F.; KNECHT, R.; AMELLAL, N.; SCHUELER, A.; BASELGA, J. Open-label, uncontrolled, multicenter phase II study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 16, p. 2171-2177, 2007.

VEUILLEZ, F.; KALIA, Y. N.; JACQUES, Y.; DESHUSSES, J.; BURI, P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 51, n. 2, p. 93-109, 2001.

VICTORELLI, F. D.; CALIXTO, G.; CHORILLI, M. Desenvolvimento de sistemas líquidos cristalinos utilizando dispersão de quitosana e polietilenoimina como fase aquosa para liberação de fármacos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, p. FM35, 2014.

VISSCHER, J. G. A. M. D. Behandeling en prognose van het mondholtcarcinoom. **Ned Tijdschr Tandheelkd**, v. 115, p. 192-198, 2008.

VUKIĆEVIĆ, M.; HEGGE, A. B.; VULIĆ, P.; TØNNESSEN, H. H. Poloxamer-based curcumin solid dispersions for ex tempore preparation of supersaturated solutions intended for antimicrobial photodynamic therapy. **Pharmaceutical Development and Technology**, p. 1-9, 2014.

WAHLSTROM, B.; BLENNOW, G. A study on the fate of curcumin in the rat. **Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)**, v. 43, n. 2, p. 86-92, 1978.

WARREN, D. B.; BENAMEUR, H.; PORTER, C. J. H.; POUTON, C. W. Using polymeric precipitation inhibitors to improve the absorption of poorly water-soluble drugs: A mechanistic basis for utility. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 10, p. 704-731, 2010.

WEINBERG, M. A.; ESTEFAN, D. J. Assessing oral malignancies. **Am Fam Physician**, v. 65, n. 7, p. 1379-1384, 2002.

WELLS, J. S.; STRICKLAND, O. L.; DALTON, J. A.; FREEMAN, S. Adherence to Intravenous Chemotherapy in African American and White Women With Early-Stage Breast Cancer. **Cancer Nursing**, 2014.

WICHITNITHAD, W.; JONGAROONNGAMSANG, N.; PUMMANGURA, S.; ROJSITTHISAK, P. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 4, p. 314-319, 2009.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supplement, n. 0, p. 128-137, 2012.

WONG, H. M. Oral Complications and Management Strategies for Patients Undergoing Cancer Therapy. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 14, 2014.

WU, H.; LI, X.; LIU, W.; CHEN, T.; LI, Y.; ZHENG, W.; MAN, C. W.-Y.; WONG, M.-K.; WONG, K.-H. Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides-protein complexes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 19, p. 9602-9610, 2012.

YAGHMUR, A.; DE CAMPO, L.; SAGALOWICZ, L.; LESER, M. E.; GLATTER, O. Emulsified Microemulsions and Oil-Containing Liquid Crystalline Phases. **Langmuir**, v. 21, n. 2, p. 569-577, 2004.

_____. Control of the Internal Structure of MLO-Based Isosomes by the Addition of Diglycerol Monooleate and Soybean Phosphatidylcholine. **Langmuir**, v. 22, n. 24, p. 9919-9927, 2006.

YAGHMUR, A.; KRIECHBAUM, M.; AMENITSCH, H.; STEINHART, M.; LAGGNER, P.; RAPPOLT, M. 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.

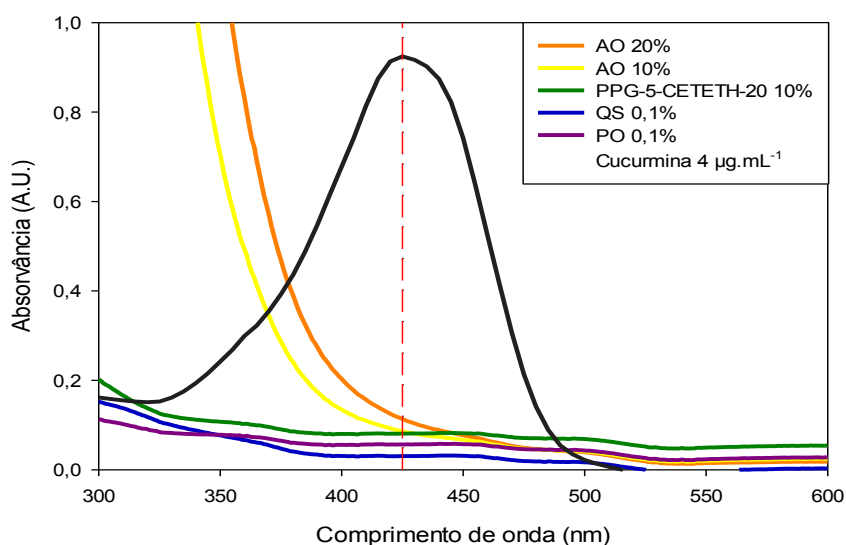
- YANG, R.; SHIM, W.-S.; CUI, F.-D.; CHENG, G.; HAN, X.; JIN, Q.-R.; KIM, D.-D.; CHUNG, S.-J.; SHIM, C.-K. Enhanced electrostatic interaction between chitosan-modified PLGA nanoparticle and tumor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 142-147, 2009.
- YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 2, p. 185-192, 2010.
- YU, B.; ZHANG, Y.; ZHENG, W.; FAN, C.; CHEN, T. Positive Surface Charge Enhances Selective Cellular Uptake and Anticancer Efficacy of Selenium Nanoparticles. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 8956-8963, 2012.
- YU, T.; ANDREWS, G. P.; JONES, D. S. Mucoadhesion and Characterization of Mucoadhesive Properties. In: NEVES, J. ; SARMENTO, B. **Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals Biology, Challenges and Strategies**. London: Springer, 2014. p.35-58.
- YUAN, Y.; CUI, Y.; ZHANG, L.; ZHU, H.-P.; GUO, Y.-S.; ZHONG, B.; HU, X.; ZHANG, L.; WANG, X.-H.; CHEN, L. Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 114-119, 2012.
- YUN CHANG, J.; OH, Y.-K.; SOO KONG, H.; JUNG KIM, E.; DEUK JANG, D.; TAEK NAM, K.; KIM, C.-K. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. **Journal of Controlled Release**, v. 82, n. 1, p. 39-50, 2002.
- ZHANG, H.; DOU, J.; ZHAI, Y.; LIU, A.; ZHAI, G. Advances in the formulations of non-injection administration of docetaxel. **Journal of Drug Targeting**, v. 22, n. 2, p. 87-94, 2014.
- ZHANG, J.; DONG, B.; ZHENG, L.; LI, N.; LI, X. Lyotropic liquid crystalline phases formed in ternary mixtures of 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide/p-xylene/water: A SAXS, POM, and rheology study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, n. 1, p. 159-165, 2008.
- ZHENG, M.; WANG, Z.; LIU, F.; MI, Q.; WU, J. Study on the microstructure and rheological property of fish oil lyotropic liquid crystal. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 385, n. 1–3, p. 47-54, 2011.
- ZHU, C.; LING, Y.; DONG, C.; ZHOU, X.; WANG, F. The Relationship between Oral Squamous Cell Carcinoma and Human Papillomavirus: A Meta-Analysis of a Chinese Population (1994–2011). **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36294, 2012.
- ZLOTOGORSKI, A.; DAYAN, A.; DAYAN, D.; CHAUSHU, G.; SALO, T.; VERED, M. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer--I: Curcumin. **Oral Oncol**, v. 49, n. 3, p. 187-191, 2013.

APÊNDICE A - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROSCOPIA POR UV-VISÍVEL QUANTIFICAR A CURCUMINA (CURCUMINOIDES)

A validação do método analítico é importante porque garante o sucesso da utilização da metodologia desenvolvida, além de detectar erros de procedimento analítico e oferecer evidências comprovadas da eficiência do método (CAUSON, 1997).

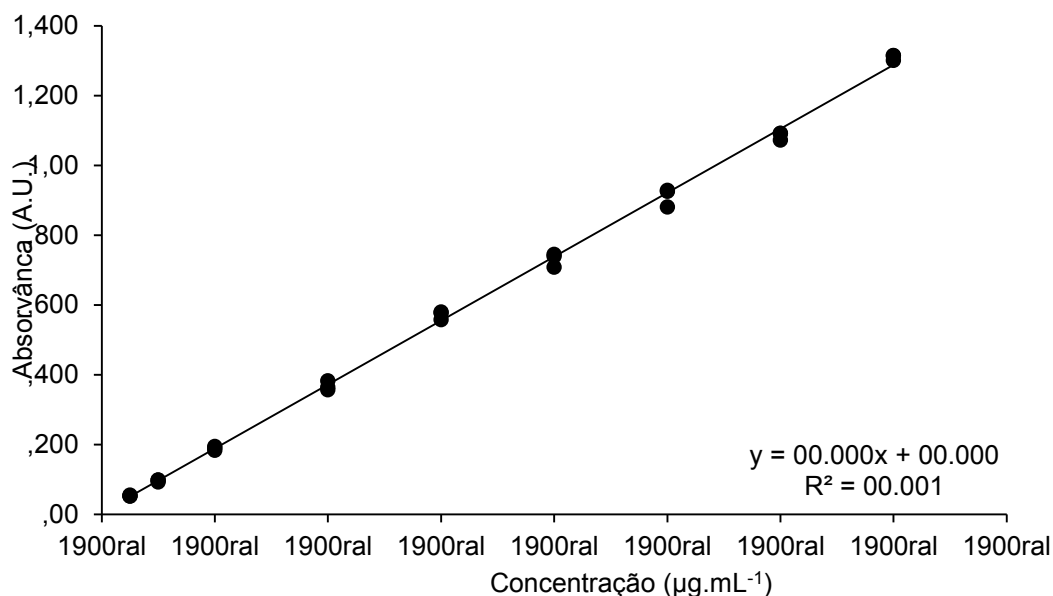
A seletividade foi determinada pela avaliação dos componentes das formulações e do padrão de curcumina $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ através de uma varredura no UV. Dessa forma foi avaliado qualquer pico de absorção máxima com os componentes na mesma região da curcumina. A figura 1 mostra o espectro de absorção dos componentes e do padrão de curcumina $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dissolvidos em etanol.

Figura 1. Varredura de absorção na ultravioleta no comprimento de onda de 300 a 600 nm da curcumina padrão 5 e dos componentes em etanol.



A linearidade do método foi verificada a partir de três curvas analíticas em 9 níveis de concentração variando de $0,25$ até $7,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sendo mostrado na figura 20. Os valores de DPR para as médias das concentrações foram menores que 5%, assim como sendo preconizado pela RE 899 (BRASIL, 2003). A análise de regressão linear dos mínimos quadrados apresentou um coeficiente de determinação de 0,99850, indicando linearidade dentro dos limites das concentrações estudadas, obtendo-se a equação da reta $y = 0,1832x + 0,0056$.

Figura 2. Curvas analíticas obtidas em função da absorvância da curcumina pelo intervalo de concentração de 0,25 à 7,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.



Através da análise de variância (Tabela 2) pode-se testar a validação do método e a significância estatística da curva ajustada. De acordo os resultados, observou-se que o método é linear e não houve falta de ajustes para as médias estudadas, apresentando um valor de F de $7,71675e^{-37}$, abaixo do valor crítico tabelado (16.680,5). Os valores de p foram menores que 0,05 para o coeficiente linear e angular sendo então que tais coeficientes são significativos para a linearidade do modelo.

Tabela 2. Resultado do tratamento estatístico por ANOVA fator único para a regressão linear.

	gl	SQ	MQ	F tabelado	F calculado
Regressão	1	4,88236058	4,882361	16680,5	$7,71675e^{-37}$
Resíduo	25	0,007317465	0,000293		
Total	26	4,889678045			

Ainda como resultado da avaliação da linearidade, calcularam-se os LD e LQ. Os resultados encontrados foram de 0,09 para LD e $0,31\mu\text{g mL}^{-1}$ para LQ. A precisão intra-corrída e precisão intermediária estão sendo mostrada na tabela 5. Podemos observar que o desvio padrão relativo foi menor que 1,65%, sendo menores de 5% estando de acordo com a RE 899. A exatidão obteve valores entre 80 e 120%, conforme descrito na RE 899. O teste t não pareado para comparação

entre as médias das concentrações dos dois dias não foram estatisticamente diferentes, obtendo um $p > ,05$. Para as concentrações de 1,0, 3,5 e 7,0. $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram obtidos valores de p de 0,4677, 0,0751 e 0,5060, respectivamente.

Tabela 3. Precisão intra-corrida e precisão intermediária do método avaliado em concentrações baixa, média e alta de curcumina.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		DPR (%)		Exatidão (%)	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1,0	0,99 $\pm$ 0,014	1,0 $\pm$ 0,008	1,38	0,83	99,3	99,9
3,5	3,57 $\pm$ 0,03	3,52 $\pm$ 0,04	0,89	1,28	101,9	100,5
6,0	6,01 $\pm$ 0,10	6,05 $\pm$ 0,10	1,65	1,64	100,1	100,8

Foi constatado, também, que o método possui robustez intrínseca, pois manteve sua resposta, em triplicata, quando se variou o comprimento de onda. As concentrações obtidas foram de 6,03 $\pm$ 0,10 (1,69%), 6,05 $\pm$ 0,10 (1,64%) e 6,17 $\pm$ 0,03 (0,48%) para os comprimentos de onda de 424 nm, 425 nm e 426 nm, respectivamente. A ANOVA para os grupos mostrou que não há diferença estatística entre as médias dos grupos ($p = 0,4995$). Dessa forma, o método foi considerado robusto.

O método apresentado foi desenvolvido e validado segundo o ICH (2005) e a RE 899 da ANVISA (BRASIL, 2003), apresentou a confiabilidade requerida para um método analítico. Além de se mostrar como uma alternativa rápida, segura e de baixo custo quando comparado ao método por CLAE.