



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SISTEMAS LÍQUIDO-CRISTALINOS
MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL DE CURCUMINA NO
TRATAMENTO DO CÂNCER CERVICAL**

Francesca Damiani Victorelli

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientadora: Dra. Giovana Maria Fioramonti Calixto

Araraquara – SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SISTEMAS LÍQUIDO CRISTALINOS
MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL DE CURCUMINA NO
TRATAMENTO DO CÂNCER CERVICAL**

Francesca Damiani Victorelli

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

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli
Coorientadora: Dra. Giovana M. F. Calixto

Araraquara-SP

2020

V643a

Victorelli, Francesca Damiani.

Avaliação do potencial de sistemas líquido cristalinos mucoadesivos para administração vaginal de curcumina no tratamento do câncer cervical / Francesca Damiani Victorelli. – Araraquara: [S.n.], 2020. 146 f. : il.

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

Orientador: Marlus Chorilli.

Coorientadora: Giovana M. F. Calixto.

1. Nanotecnologia farmacêutica. 2. Sistemas líquido-cristalinos. 3. Câncer cervical. 4. Nanopartículas. 5. Curcumina. 6. Administração vaginal. I. Chorilli, Marlus, orient. II. III. Calixto, Giovana M. F., coorient. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

Agradecimentos

Agradeço à Deus por me presentear com oportunidades e pessoas que enriqueceram a minha vida e por me orientar nas minhas decisões difíceis.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela confiança, dedicação, compreensão, orientação e conselhos de sempre e por mais uma vez ter aberto as portas do laboratório para mim. Muito obrigada pelos incentivos e oportunidades.

À minha co-orientadora Giovana Calixto pela grande ajuda de sempre, pela atenção, suporte e disponibilidade (mesmo com o Lorenzo do lado, rs), além da sua amizade.

Aos meus familiares e amigos, especialmente ao meu pai Fausto Victorelli Jr. e minha mãe Márcia Damiani Victorelli, que sempre me encorajam e me apoiam nas minhas decisões, me orientando e dando todo o suporte necessário. Por todo amor, carinho, apoio, incentivo e ensinamentos que me forneceram base necessária para vencer mais esta etapa. E, sobretudo, pela confiança que sempre depositaram em mim. Ao meu irmão Fausto Damiani Victorelli, por ser a minha inspiração para adquirir sempre mais conhecimento.

Ao meu noivo Rafael Fuzaro pelo amor, paciência, companhia, parceria, compreensão e incentivo de sempre.

À todos os meus amigos do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica que de alguma forma me ajudaram: Andressa Pironi, Paula Scanavez, Mariza Aires, Valéria Cardoso, Camila Roderio, Mariana Sato, Eliete Von Zuben, Leda Robusti, Patrícia Rocha, Karen Santos, Bruno Fonseca, Franciele Baveloni, Lucas Noboru, Fernanda Boni, Natália G. dos Santos, Natália Noronha, Aline Perissinato, Aline Martins, Vivian Ruz, Andréia Meneguim, e a amável Dona Neusa, muito obrigada por tornarem os meus dias mais divertidos, por dividirem comigo as angústias e alegrias e por todo carinho e amizade.

À gentil Prof.^a Dr.^a Herida Regina Nunes Salgado pela parceria na utilização dos equipamentos. Aos alunos do laboratório de Controle de Qualidade. Muito obrigada pela atenção, paciência e assistência.

Aos professores de Farmacotécnica Dr.^a Palmira D. Gremião; Dr. Anselmo G. Oliveira e Dr.^a Beatriz Stringhetti Ferreira Cury pela parceria na utilização dos equipamentos, pelas contribuições, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Raffaele Mezzenga, Dra. Livia Salvati Manni e ao Instituto Federal de Tecnologia de Zurique (ETH), por todo o apoio e estrutura, além de todo incentivo e conhecimento adquirido no BEPE.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2017/23357-2 e processo BEPE nº 2019/03929-7, pelo financiamento dessa pesquisa e auxílio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao pessoal da Seção Técnica de Pós-Graduação que sempre foram muito atenciosos e prestativos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. À Prof.^a Dr.^a Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, coordenadora do programa de Ciências Farmacêuticas e aos demais membros do conselho do programa.

Muito obrigada a todos que contribuíram para a realização desse projeto e da melhor formar possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
 CAPÍTULO 1 - Avaliação do potencial de sistemas líquido cristalinos mucoadesivos para administração vaginal de curcumina no tratamento do câncer cervical.....	 21
RESUMO CAPÍTULO 1.....	22
ABSTRACT CHAPTER 1.....	23
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
1.1.Câncer.....	24
1.2.Câncer Cervical.....	25
1.2.1. Fisiopatologia.....	25
1.2.2. Prevenção.....	26
1.2.3. Tratamento do Câncer Cervical.....	26
1.3.Curcumina.....	27
1.4.Via de administração vaginal.....	30
1.5.Nanotecnologia Farmacêutica	30
1.5.1. Sistemas líquidos cristalinos.....	31
1.5.1.1.Mesofases.....	32
1.5.1.2.Ácido Oleico.....	33
1.5.2. Álcool cetílico etoxilado 20 e propoxilado 5 (Procetyl® AWS).....	34
1.5.3. Polímeros	34
1.5.3.1.Quitosana (QS)	35
1.5.3.2.Polietilenoimina (PEI)	35

1.6. Ensaio <i>in vivo</i> alternativo: modelo de membrana corioalantóica em ovos de galinha (CAM)	37
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. Objetivo Geral.....	39
2.2. Objetivos específicos.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Materiais.....	40
3.2. Métodos.....	41
3.2.1. Preparação das formulações.....	41
3.2.2. Análise estrutural das formulações.....	42
3.2.2.1. Microscopia de luz polarizada.....	42
3.2.2.2. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	42
3.2.2.3. Determinação do comportamento reológico.....	43
3.2.2.3.1. Análise reológica cisalhamento contínuo (fluxo).....	43
3.2.2.3.2. Análise reológica oscilatória.....	43
3.2.2.4. Análise de perfil de textura.....	44
3.2.2.5. Estudo <i>in vitro</i> de mucoadesão.....	44
3.2.3. Validação da metodologia analítica para quantificação de curcumina por cromatografia líquida de alta eficiência.....	45
3.2.3.1. Seletividade.....	45
3.2.3.2. Linearidade.....	46
3.2.3.3. Precisão.....	46
3.2.3.4. Exatidão.....	46
3.2.3.5. Limite de Detecção.....	46
3.2.3.6. Limite de Quantificação.....	47
3.2.3.7. Doseamento do fármaco no sistema líquido cristalino.....	47
3.2.4. Ensaio de liberação, permeação e retenção <i>in vitro</i>	47
3.2.4.1. Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> da curcumina.....	47
3.2.4.2. Ensaio de permeação e retenção <i>in vitro</i> da curcumina.....	47
3.2.5. Ensaio de citotoxicidade.....	49
3.2.5.1. Teste de citotoxicidade por difusão em meio ágar <i>in vitro</i> em linhagem celular fibroblastos (L929) e de câncer cervical (Hela)	49

3.2.6. Ensaio <i>in vivo</i> utilizando o modelo de membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM)	51
3.2.6.1. Obtenção do modelo de CAM.....	51
3.2.6.2. Ensaio para avaliação das alterações vasculares da CAM.....	51
3.2.6.3. Grupos experimentais.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. Preparação das formulações.....	52
4.2. Análise estrutural das formulações.....	54
4.2.1. Microscopia de luz polarizada (MLP)	54
4.2.2. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	56
4.2.3. Determinação do comportamento reológico.....	59
4.2.3.1. Análise reológica de cisalhamento contínuo (fluxo).....	59
4.2.3.2. Análise reológica oscilatória.....	64
4.2.4. Análise de perfil de textura.....	68
4.2.5. Estudo <i>in vitro</i> de mucoadesão.....	71
4.3. Validação da metodologia analítica para quantificação de curcumina por cromatografia líquida de alta eficiência.....	73
4.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico.....	73
4.3.2. Seletividade.....	75
4.3.3. Linearidade.....	76
4.3.4. Precisão.....	79
4.3.4.1. Repetibilidade.....	80
4.3.4.2. Precisão intermediária.....	80
4.3.4. Exatidão.....	81
4.3.5. Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	82
4.3.6. Doseamento do fármaco no sistema líquido cristalino.....	82
4.4. Ensaio de liberação, permeação e retenção <i>in vitro</i>	82
4.4.1. Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> da curcumina.....	83
4.4.2. Ensaio de permeação e retenção <i>in vitro</i> da curcumina.....	84
4.5. Ensaio de citotoxicidade.....	85
4.5.1. Teste de citotoxicidade por difusão em meio ágar <i>in vitro</i> em linhagem celular fibroblastos (L929) e de câncer cervical (Hela)	85

4.6. Ensaio <i>in vivo</i> utilizando o modelo de membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM)	87
4.6.1. Ensaio para avaliação das alterações vasculares da CAM.....	87
5. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

CAPÍTULO 2: Nanopartículas Líquido Cristalinas como um novo sistema de administração de fármacos para a administração de CUR: potencial aplicação para o tratamento do câncer cervical.....114

RESUMO CAPÍTULO 2.....	115
ABSTRACT CHAPTER 2.....	116
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	117
1.1. Introdução.....	117
1.2. Nanopartículas líquidas cristalinas.....	117
1.2.1. Fase cúbica e cubossomos.....	118
1.3. Monooleína.....	119
1.4. DOTAP.....	120
1.5. Poloxamer 427.....	120
2. OBJETIVOS.....	121
2.1. Objetivo Geral.....	121
2.2. Objetivos específicos.....	121
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	121
3.1. Materiais.....	121
3.2. Métodos.....	122
3.2.1. Desenvolvimento dos sistemas líquidos cristalinos (Bulk) (SLCs).....	122
3.2.2. Desenvolvimento das nanopartículas líquidas cristalinas (NPLCs).....	123
3.2.3. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	123
3.2.4. Medida do tamanho de partícula e índice de polidispersividade.....	124
3.2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica (MET-Crio).....	124
3.2.6. Validação da metodologia analítica para quantificação da curcumina pelo leitor de microplacas.....	124
3.2.7. Eficiência de encapsulação.....	125

3.2.8. Ensaio de liberação, permeação e retenção <i>in vitro</i>	125
3.2.8.1. Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> da curcumina.....	125
3.8.2. Ensaio de permeação e retenção <i>in vitro</i> da curcumina.....	126
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	126
4.1. Desenvolvimento dos sistemas líquidos cristalinos (Bulk) (SLCs).	126
4.2. Desenvolvimento das nanopartículas líquidas cristalinas (NPLCs).....	128
4.3. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	129
4.4. Medida do tamanho de partícula e índice de polidispersividade.....	133
4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica (MET-Crio)	134
4.6. Validação da metodologia analítica para quantificação da curcumina pelo leitor de microplacas.....	135
4.6.1. Linearidade.....	135
4.6.2. Precisão e Exatidão.....	136
4.7. Eficiência de encapsulação.....	137
4.8. Ensaio de liberação, permeação e retenção <i>in vitro</i>	137
4.8.1. Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> da curcumina.	137
4.8.2. Ensaio de permeação e retenção <i>in vitro</i> da curcumina.....	140
5. CONCLUSÃO.....	141
CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 1 E CAPÍTULO 2.....	141
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da Curcumina.....	27
Figura 2. Representação das diferentes fases líquido cristalinas: a. Fase lamelar; b.1. Fase hexagonal normal; b.2. Fase hexagonal reversa; c. Fase cúbica.....	32
Figura 3. Estrutura do Ácido Oleico.....	33
Figura 4. Estrutura de um álcool graxo etoxilado e propoxilado (PPG-5-Ceteth 20).....	34
Figura 5. Estrutura da quitosana.....	35
Figura 6. Estrutura de um segmento de PEI.....	36
Figura 7. Figura (A) ilustra a mucosa vaginal de porca. Figura (B) ilustra a mucosa sobre a célula de difusão de Franz. Figura (C) ilustra a mucosa no final do experimento.....	49
Figura 8. Placa de seis poços utilizada no método de difusão em ágar.....	50
Figura 9. Diagrama de linha do sistema FPC, FPC30, FPC50 e FPC100.....	53
Figura 10. Fotografia das seguintes formulações: FW (a); FW30 (b); FW50 (c); FW100 (d); FPC (e); FPC30 (f), FPC50 (g) e FPC100 (h).....	54
Figura 11. As formulações FW (1), FW30 (2), FW50 (3) apresentaram estrias e cruz de malta e FW100 (4) apresentou campo escuro e cruz de malta.....	55
Figura 12. As formulações FPC (1), FPC30 (2), FPC50 (3) apresentaram estrias e cruz de malta e a formulação FPC100 (4) apresentou campo escuro e cruz de malta.....	56
Figura 13. Avaliação estrutural das formulações FPC e FPCC por SAXS.....	58
Figura 14. Reogramas de fluxo das formulações ilustram a relação entre tensão de cisalhamento (Pa) e taxa de cisalhamento (1/s) de FW, FWC, FW30, FW30C, FW50, FW50C, FW100, FW100C à 25,0°C e 37,0°C. Símbolos fechados representam a curva de ida e símbolos abertos representam a curva de volta.....	60
Figura 15. Reogramas de fluxo das formulações ilustram a relação entre tensão de cisalhamento (Pa) e taxa de cisalhamento (1/s) de FPC, FPCC, FPC30, FPC30C, FPC50, FPC50C, FPC100, FPC100C à 25,0°C e 37,0°C. Símbolos fechados representam a curva de ida e símbolos abertos representam a curva de volta.....	61
Figura 16. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência de FW, FWC, FW30, FW30C, FW50, FW50C, FW100 e FW100C à 25,0°C e 37,0°C.....	65
Figura 17. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência de FPC, FPCC, FPC30, FPC30C, FPC50, FPC50C, FPC100 e FPC100C à 25,0°C e 37,0°C.....	66

Figura 18. Perfil de textura das formulações FW e FPC com e sem adição de muco 30%, 50%, 100% e CUR. A Figura (a) indica a dureza das formulações, (b) indica a compressividade, (c) a adesividade e (d) a coesão.....	71
Figura 19. (a) força e (b) trabalho de mucoadesividade das formulações FW, FW30, FW50, FW100, FWC, FW30C, FW50C, FW100C, FPC, FPC30, FPC50, FPC100, FPCC, FPC30C, FPC50C, FPC100C à temperatura de 37,0°C.....	73
Figura 20. Cromatograma da CUR obtido pelo método cromatográfico proposto.....	75
Figura 21. (a) Cromatograma da fase móvel (50% acetonitrila e 50% ácido acético 2%); (b) Cromatograma FW diluída em metanol; (c) Cromatograma FW diluída em meio receptor; (d) Cromatograma FPC diluída em metanol; (e) Cromatograma FPC diluída em meio receptor; (f) Cromatograma mucosa em metanol.....	76
Figura 22. Curva analítica da CUR em metanol obtida pelo método cromatográfico. Fase móvel: ácido acético 2% e acetonitrila (50:50 v/v); Coluna: C18-Eclipse (4,6 mm x 250mm) 5 µm; Vazão: 1,2 mL/min.; λ: 425 nm; Injeção: 20µL; 33°C.....	77
Figura 23. Curva analítica da CUR em meio receptor obtida pelo método cromatográfico. Fase móvel: ácido acético 2% e acetonitrila (50:50 v/v); Coluna: C18-Eclipse (4,6 mm x 250mm) 5 µm; Vazão: 1,2 mL/min.; λ: 425 nm; Injeção: 20µL; 33°C.	79
Figura 24. Perfil de liberação <i>in vitro</i> (%), com membrana de poliétersulfona 0,45 µm, de CUR incorporada nas formulações FW, FPC contendo CUR 0,5% e suspensão contendo CUR 0,5% (FL).....	83
Figura 25. Análise visual das alterações vasculares causadas pelo controle e formulações FW, FPC, FWC e FPCC no medelo CAM.....	89
Figura 26. Apresentação esquemática das fases (A) cúbica tireoidiana (Ia3d), cúbica diamante duplo (Pn3m) e (C) cúbica primitivo (Im3m).....	119
Figura 27. Estrutura química da monooleína.....	120
Figura 28. Estrutura química do DOTAP.....	120
Figura 29. Estrutura química do Pluronic F127.....	120
Figura 30. Figura (A) mostra a MO, DOTAP fundido com CUR. Figura (B) mostra a formulação com excesso de tampão de acetato pH 4,4. Figura (C) mostra a formulação depois de ter sido aquecida e agitada por vortex. Figura (D) mostra a formulação após a sonicação.	129

Figura 31. SAXS das formulações A e B. A linha azul mostra a análise à 25,0°C e a linha laranja mostra a análise à 37,0°C. A Figura (A) mostra a análise da amostra com 100% de MO e tampão acetato de pH 4,4. A Figura (B) mostra a análise da amostra com 95% de MO, 5% de CUR e tampão acetato pH 4,4.....	130
Figura 32. SAXS das formulações C, D, E e F. A linha azul mostra a análise à 25,0°C e a linha laranja mostra a análise à 37,0°C. A Figura (A) mostra a análise da amostra com 95% de MO, 5% de DOTAP e tampão acetato de pH 4,4. A Figura (B) mostra a análise da amostra com 90% de MO, 5% de DOTAP, 5% de CUR e tampão acetato pH 4,4. A Figura (C) mostra a análise da amostra com 95% de MO, 5% de DOTAP e QS + PEI + tampão acetato pH 4,4. A Figura (D) mostra a análise da amostra com 90% de MO, 5% de DOTAP, 5% de CUR e QS + PEI + tampão acetato pH 4,4.....	131
Figura 33. SAXS das formulações G, H, I e J. A linha azul mostra a análise à 25,0°C e a linha laranja mostra a análise à 37,0°C. A Figura (A) mostra a análise da amostra com 80% de MO, 20% de ácido oleico e tampão de acetato pH 4,4. A Figura (B) mostra a análise da amostra com 75% de MO, 20% de ácido oleico, 5% de CUR e tampão acetato pH 4,4. A Figura (C) mostra a análise da amostra com 80% de MO, 20% de ácido oleico, 10% de QS + PEI e tampão de acetato pH 4,4. A Figura (D) mostra a análise da amostra com 75% de MO, 20% de ácido oleico, 5% de CUR, 10% de QS + PEI e tampão de acetato pH 4,4.....	132
Figura 34. SAXS das nanodispersões K e L. A linha azul mostra a análise à 25,0°C e a linha laranja mostra a análise à 37,0°C. A Figura (A) mostra a análise da amostra com 95% de MO, 5% de DOTAP e tampão acetato de pH 4,4. A Figura (B) mostra a análise da amostra com 90% de MO, 5% de DOTAP, 5% de CUR e tampão acetato pH 4,4.....	133
Figura 35. Fotomicrografias de nanopartículas de cristal líquido obtidas por análise de microscopia eletrônica de transmissão. A Figura (A) mostra as nanopartículas sem a presença de curcumina e a Figura (B) mostra as nanopartículas com a presença de curcumina.....	134
Figura 36. Espectro de absorvância de CUR.....	135
Figura 37. Curva de calibração da CUR.....	136
Figura 38. Formulação final - cubossomos carregados com curcumina.....	137
Figura 39. A Figura (A) mostra que a membrana foi colocada sobre o meio receptor. A Figura (B) mostra que o meio receptor não passou pela membrana de polietersulfona.....	138

Figura 40. Perfil de liberação in vitro (%), com membrana de poliétersulfona 0,45 µm, de CUR incorporada na formulação CH contendo CUR 3% e suspensão contendo CUR 0,5%.....139

Figura 41. Perfil de liberação in vitro (%), com membrana de poliétersulfona 0,45 µm, de CUR incorporada na formulação NPLCs contendo CUR 0,1% e suspensão contendo CUR 0,5%.....139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas desenvolvidos.....	42
Tabela 2. Parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica.....	45
Tabela 3. Graus de citotoxicidade para classificação das amostras.....	50
Tabela 4. Grupos experimentais para a realização do ensaio utilizando o modelo CAM.....	52
Tabela 5. Índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) das formulações FW, FW30, FW50, FW100, FWC, FW30C, FW50C, FW100C, FPC, FPC30, FPC50, FPC100, FPCC, FPC30C, FPC50C e FPC100C à 25,0°C e 37,0°C.....	62
Tabela 6. Valores da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) para as formulações FW, FW30, FW50, FW100, FWC, FW30C, FW50C, FW100C, FPC, FPC30, FPC50, FPC100, FPCC, FPC30C, FPC50C e FPC100C à 25,0°C e 37,0°C.....	67
Tabela 7. Parâmetros investigados para avaliar a conformidade do sistema cromatográfico empregado para análise da CUR.....	74
Tabela 8. Valores das áreas referentes ao pico de CUR em metanol para construção da curva analítica por CLAE.....	77
Tabela 9. Valores das áreas referentes ao pico de CUR em meio receptor para construção da curva analítica por CLAE.....	78
Tabela 10. Análise de variância dos valores das áreas determinados na obtenção da curva analítica de CUR em metanol.....	79
Tabela 11. Análise de variância dos valores das áreas determinados na obtenção da curva analítica de CUR em meio receptor.....	79
Tabela 12. Determinação da precisão intracorrida (Repetibilidade) de CUR no metanol por CLAE.....	80
Tabela 13. Determinação da precisão intermediária de CUR no metanol por CLAE.....	81
Tabela 14. Exatidão do método analítico para análise de CUR na FW e FPC em metanol.....	81
Tabela 15. Exatidão do método analítico para análise de CUR na FW e FPC em meio receptor.....	82
Tabela 16. Doseamento da CUR nos SLCs.....	82

Tabela 17.	Comparação da retenção na mucosa da CUR entre as amostras.....	85
Tabela 18.	Medidas de extensão (cm) dos halos.....	86
Tabela 19.	Parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica.....	125
Tabela 20.	Componentes da fase oleosa.....	127
Tabela 21.	Componentes dos bulks.....	128
Tabela 22.	Componentes das nanopartículas.....	128
Tabela 23.	Tamanho das partículas e PDI pelo método de dispersão dinâmica da luz à 25,0°C e 37,0°C.....	134
Tabela 24.	Precisão e exatidão do método espectrofotômetro UV-visível para análise da CUR.....	136
Tabela 25.	Concentração teórica e real das nanopartículas.....	137
Tabela 26.	Retenção de CUR livre em AO, CH e NPLCs na mucosa vaginal.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

AO – ácido oleico

Ca(OH)₂ – Hidróxido de cálcio

CAM- Membrana Corioalantóica de Embrião da galinha (CAM)

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

CUR – Curcumina

DOTAP – 1,2-di-oleil-3 trimetil-amônio-propano

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EM – Emulsão

EPR – “Efeito Enhanced Permeability and Retention”

FL – Fármaco livre

G' – Módulo de armazenamento

G'' – Módulo de perda

HCL – Ácido clorídrico

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

KOH – Hidróxido de Potássio

HPV – Papilomavírus humano

MO – Monooleína

ME – Microemulsão

MET-Crio – Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica

MLP – Microscopia de luz polarizada

MMPs- Metaloproteinases da Matriz

NaCl – Cloreto de sódio

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

NPLCs – Nanopartículas líquidos cristalinos

Pa – Pascal

PDI – Polidispersividade

PEI – Polietilenoimina

QS – Quitosana

SAXS – Espalhamento de raios X a baixo ângulo

SF- Separação de fase

RESUMO

O câncer cervical é o tumor ginecológico que mais causa mortes no mundo entre as mulheres, representando um grande problema de saúde pública. Os tratamentos convencionais envolvem a realização de cirurgia ginecológica, radioterapia e radioquimioterapia, que são restritos e apresentam vários efeitos colaterais, impactando negativamente na qualidade de vida das pacientes. Tendo em vista esse cenário, é de extrema importância a pesquisa de novas moléculas bioativas para uso no tratamento antitumoral, como a curcumina (CUR), que atua por indução de apoptose em células cancerígenas. Todavia, ela apresenta baixa solubilidade aquosa, que dificulta a sua utilização. Para resolver esse problema, alternativas estratégicas são sua incorporação em sistemas líquido-cristalinos (SLCs) e nanopartículas líquidas cristalinas (NPLCs). Esses sistemas apresentam a capacidade de controlar a liberação de fármaco, além de potencializarem a sua ação, acarretando em aumento da sua concentração no tumor e redução de danos no tecido normal. O objetivo do capítulo 1 foi desenvolver SLCs constituídos de álcool cetílico etoxilado 20 e propoxilado 5, ácido oleico e fase aquosa contendo água (FW) ou dispersão de quitosana associada a polietilenoimina (FPC) para administração vaginal de CUR e caracterizá-los empregando a microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS), reologia, perfil de textura e mucoadesão além de realizar estudos de liberação, permeação e retenção *in vitro*, ensaio de citotoxicidade e verificar as alterações vasculares no modelo membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM). Já o objetivo do capítulo 2 foi desenvolver SLCs constituídos por monooleína e ácido oleico (CH) e NPLCs constituídas por monooleína, DOTAP e poloxamer 127 e caracterizá-los empregando o espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS), tamanho de partícula e polidispersidade e microscopia eletrônica de transmissão criogênica (Cryo-TEM) além de realizar estudos de liberação, permeação e retenção *in vitro*. Os resultados da MLP e SAXS revelaram que a formulação FPC apresentou fase lamelar, a formulação CH fase hexagonal e as NPLCs fase cúbica. Os resultados sugeriram que as NPLCs possuem escala nanométrica, uma vez que as partículas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio entre 166,67 a 182,71 nm e índice de polidispersidade na faixa de 0,126 a 0,278. O Cryo-TEM das NPLCs mostrou que houve a formação de cubossomos. A reologia mostrou que as formulações FPC e FW apresentaram comportamento pseudoplástico e tixotropia e FPC demonstrou melhores propriedades mecânicas e mucoadesivas, cujo desempenho é desejável para formulações de uso tópico. Os estudos de liberação, permeação e retenção *in vitro* mostraram que a formulação FPC liberou em 12 horas 7,79%, FW 7,04%, CH 1,82% e as NPLCs 42,04% de CUR, agindo como sistemas de liberação prolongada. As formulações FW e FPC reteram na mucosa vaginal em torno de 2,3%, CH 1,11% e as NPLCs 8,88% de CUR. As formulações FW e FPC contendo ou não CUR apresentaram biocompatibilidade com as células L929 e toxicidade para as células Hela. Por fim, foi possível observar uma diminuição no calibre e o número vasos na CAM após a aplicação de FPC. Portanto, tendo em vista os resultados obtidos pode-se concluir que os sistemas desenvolvidos apresentaram características interessantes para o tratamento de câncer cervical.

Palavras-chave: nanotecnologia farmacêutica, sistemas líquido-cristalinos, nanopartículas, curcumina, administração vaginal, câncer cervical.

ABSTRACT

Cervical cancer is the gynecological tumor that causes the most deaths in the world among women, representing a major public health problem. Conventional treatments involve gynecological surgery, radiotherapy and radiochemotherapy, which are restricted and have several side effects, negatively impacting patients' quality of life. In view of this scenario, it is extremely important to search for new bioactive molecules for use in antitumor treatment, such as curcumin (CUR), which acts by inducing apoptosis in cancer cells. However, it has low aqueous solubility, which makes its use difficult. To solve this problem, a strategic alternative is its incorporation into liquid crystalline systems (LCSs) and liquid crystalline nanoparticles (LCNPs). These systems have the ability to control drug release, in addition to potentiating their action, resulting in increased concentration in the tumor and reduced damage to normal tissue. The objective of Chapter 1 was to develop SLCs containing ethoxylated 20 and propoxylated 5 cetyl alcohol, oleic acid and aqueous phase containing water (FW) or dispersion of chitosan associated with polyethyleneimine (FPC) for vaginal administration of CUR and to characterize them using microscopy polarized light (MLP), low-angle X-ray scattering (SAXS), rheology, texture profile and mucoadhesion in addition to conducting *in vitro* release, permeation and retention studies, cytotoxicity assay and checking vascular changes in the chorioallantoic membrane model of chicken embryo (CAM). The objective of Chapter 2 was to develop SLCs containing monoolein, oleic acid and aqueous phase containing dispersion of chitosan associated with polyethyleneimine and NPLCs consisting of monoolein, DOTAP and poloxamer 127 and to characterize them using low angle X-ray scattering (SAXS), particle size and polydispersity and cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM) in addition to conducting *in vitro* release, permeation and retention studies. The results of MLP and SAXS revealed that the FPC formulation presented lamellar phase, the CH formulation hexagonal phase and the NPLCs cubic phase. The results suggested that NPLCs have a nanoscale scale, since the particles had a diameter between 166.67 to 182.71 nm and PDI in the range of 0.126 to 0.278. The Cryo-TEM of the NPLCs showed that cubosomes were formed. Rheology determined that the formulations FPC and FW showed pseudoplastic and thixotropic behavior and FPC demonstrated better mechanical and mucoadhesive properties, which performance is desirable for topical formulations. The *in vitro* release, permeation and retention studies showed that the formulation FPC released in 12 hours 7.79%, FW 7.04%, CH 1.82% and NPLCs 42.04% of CUR, acting as delivery systems prolonged. The formulations FW and FPC retain in the vaginal mucosa around 2.3%, CH 1.11% and NPLCs 8.88% CUR. The formulations FW and FPC containing or not CUR showed biocompatibility with L929 cells and toxicity for Hela cells. Finally, it was possible to observe a decrease in the caliber and the number of vessels in the CAM after the application of FPC. Therefore, in view of the results obtained, it can be concluded that the developed systems presented interesting characteristics for the treatment of cervical cancer.

Key words: pharmaceutical nanotechnology, liquid-crystalline systems, nanoparticles, curcumin, vaginal administration, cervical cancer.

INTRODUÇÃO

A redação dessa dissertação foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo se destina ao desenvolvimento e caracterização de sistemas líquidos cristalinos acrescidos de curcumina, bem como o ensaio de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, ensaio citotóxico *in vitro* e ensaio de alteração vascular *in vivo* com modelo da membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM). Estes estudos foram realizados em sua maioria na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. O segundo capítulo se destina ao desenvolvimento e caracterização de um novo sistema de liberação de fármaco, as nanodispersões líquidas cristalinas, bem como o ensaio de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*. Este estudo foi realizado no mestrado sanduíche, o qual foi desenvolvido no Instituto Federal de Tecnologia de Zurique (ETHZ), Suíça, sob a supervisão do Prof. Dr. Raffaele Mezzenga.

O câncer cervical é o terceiro câncer mais comum que afeta as mulheres (FREITAS et al., 2014), é responsável por 530 mil novos casos e causa 270 mil mortes em todo o mundo a cada ano (WHO, 2016), representando um grande problema de saúde pública.

Este câncer pode ser tratado com cirurgia, radioterapia ou radioquimioterapia, todos impactando negativamente na qualidade de vida da mulher e frequentemente com prognóstico desfavorável (GREIMEL et al., 2009; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2017; INCA, 2017; RAVAL et al., 2012). Portanto, é interessante a pesquisa de novas moléculas bioativas para uso na terapia antitumoral, bem como a utilização de vias alternativas para administração dos fármacos empregados no tratamento.

A curcumina (CUR) é um produto natural isolado dos rizomas da planta de *Curcuma longa* (SHARMA et al., 2005). Este fármaco apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antiproliferativas, antiangiogênicas e anticancerígenas (SALMAZI et al., 2015), podendo agir como quimiopreventivo e terapêutico contra vários tipos de câncer como de mama, cervical, intestino, hepático, ovário, pancreático e próstata. Uma característica muito interessante da CUR é que ela é capaz de proteger as células saudáveis, devido a sua capacidade antioxidante, enquanto induz apoptose em células cancerígenas (CHEN et al., 2016; DUVOIX et al., 2005; KUNNUMAKKARA et al., 2008). Além disso, a CUR inibe as metaloproteinases da matriz (MMPs) tipo 2 e 9 (LEE et al., 2015; KOIVUNEN et al., 1999), o que contribui para a diminuição do crescimento tumoral.

A CUR é uma molécula altamente lipofílica que percorre rapidamente a membrana celular e não é tóxica para células normais (GHALANDARLAKI et al., 2014), porém apresenta pouca solubilidade em água, baixa meia-vida e instabilidade química, o que diminui a sua

biodisponibilidade (GHALANDARLAKI et al., 2014; SUN et al., 2012; AHMAD et al., 2015). Assim, uma estratégia para viabilizar sua utilização é a sua incorporação em sistemas de liberação de fármacos, como sistemas líquido-cristalinos (SLCs) e nanopartículas líquido cristalinas (NPLCs) para administração vaginal.

A via vaginal é uma via de administração de fármacos que apresenta grandes vantagens como a ausência do efeito de primeira passagem (SILVA et al., 2014; YANG et al., 2014). Porém, esta via pode também apresentar características desfavoráveis como a secreção de fluídos, o que contribui para a remoção fácil da formulação, exigindo um maior número de aplicações em um intervalo de tempo menor (FRANK et al., 2014, VALENTA et al., 2005).

Portanto, torna-se necessário o uso de sistemas de liberação de fármacos com características mucoadesivas para superar os desafios supracitados da via vaginal, pois esses sistemas conseguem proteger os quimioterápicos contra a degradação físico- química, aumentar seu tempo de permanência no ambiente vaginal e controlar a sua liberação (KANG et al., 2009; EL-HAMMADI; ARIAS, 2016), de forma a possibilitar um tratamento local do câncer cervical (ZONG et al., 2015).

Dentre os sistemas nanoestruturados, os sistemas líquidos cristalinos (SLCs) apresentam características interessantes uma vez que combinam as propriedades de um cristal sólido com as de um líquido isotrópico, podendo proteger os fármacos e possibilitar a sua liberação controlada (SALMAZI et al., 2015; BERNEGOSSO et al., 2016; CHORILLI et al., 2016; CALIXTO et al., 2016, CINTRA et al., 2016). Os SLCs podem apresentar as mesofases hexagonal, cúbica e lamelar (CALIXTO et al., 2017). Já as nanopartículas apresentam mesofases hexagonal e cúbica, denominadas como hexossomos e cubossomos, respectivamente SPICER et al., 2005; YAGHMUR et al., 2009; LANCELOT et al., 2014; HIRLEKAR et al., 2010).

Portanto, tendo como base o panorama atual desfavorável às modalidades terapêuticas convencionais para o tratamento do câncer cervical, acredita-se que a incorporação de CUR em SLCs e NPLCs possa ser uma ferramenta nanobiotecnológica promissora para o tratamento do câncer cervical.

CAPÍTULO 1

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SISTEMAS LÍQUIDO LÍQUIDO-CRISTALINOS
MUCOADESIVOS PARA ADMINISTRAÇÃO VAGINAL DE CURCUMINA NO
TRATAMENTO DO CÂNCER CERVICAL**

RESUMO CAPÍTULO 1

O câncer cervical é o tumor ginecológico que mais causa mortes no mundo entre as mulheres, representando um grande problema de saúde pública. Os tratamentos convencionais envolvem a realização de cirurgia ginecológica, radioterapia e radioquimioterapia, que são restritos e apresentam vários efeitos colaterais, impactando negativamente na qualidade de vida das pacientes. Tendo em vista esse cenário, é de extrema importância a pesquisa de novas moléculas bioativas para uso no tratamento antitumoral, como a curcumina (CUR), que atua por indução de apoptose em células cancerígenas. Todavia, ela apresenta baixa solubilidade aquosa, que dificulta a sua utilização. Para resolver esse problema, uma alternativa estratégica é sua incorporação em sistemas líquido-cristalinos (SLCs) para administração vaginal, uma vez que esta via é de extrema utilidade quando se deseja um efeito local do fármaco, evitando o metabolismo de primeira passagem. Os SLCs apresentam a capacidade de controlar a liberação de fármaco, além de potencializarem a sua ação, acarretando em aumento da sua concentração no tumor e redução de danos no tecido normal. Neste sistema ainda é possível adicionar polímeros como a quitosana (QS) e polietilenoimina (PEI), que contribuem com o aumento da viscosidade e, assim, com o aumento do tempo de contato da formulação com a mucosa vaginal. O objetivo deste trabalho foi desenvolver SLCs constituídos de álcool cetílico etoxilado 20 e propoxilado 5, ácido oleico e fase aquosa contendo água (FW) ou dispersão de quitosana associada a polietilenoimina (FPC) para administração vaginal de CUR e caracterizá-los empregando a microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS), reologia, perfil de textura e mucoadesão além de realizar estudos de liberação, permeação e retenção *in vitro*, ensaio de citotoxicidade e verificar as alterações vasculares no modelo membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM). Os resultados da MLP e SAXS revelaram que a formulação FPC apresentou fase lamelar. A reologia mostrou que as formulações FPC e FW apresentaram comportamento pseudoplástico e tixotropia e FPC demonstrou melhores propriedades mecânicas e mucoadesivas, cujo desempenho é desejável para formulações de uso tópico. FPC liberou 7,79% de CUR em 12 horas e FW liberou 7,04% em 12 horas, agindo como sistemas de liberação sustentada e ambos os sistemas reteram em torno de 2,3% de CUR na mucosa vaginal. As formulações apresentaram biocompatibilidade com as células L929 e toxicidade para as células Hela. Por fim, foi possível observar uma diminuição no calibre e o número vasos na CAM após a aplicação de FPC. Portanto, tendo em vista os resultados obtidos pode-se concluir que os sistemas desenvolvidos apresentaram características interessantes para o tratamento de câncer cervical.

Palavras-chave: nanotecnologia farmacêutica, sistemas líquido-cristalinos, mucoadesão, curcumina, administração vaginal, câncer cervical.

ABSTRACT CHAPTER 1

Cervical cancer is the gynecological tumor that causes most deaths in the world among women, representing a major public health problem. Conventional treatments involve gynecological surgery, radiotherapy and radiochemotherapy, which are restricted and have several side effects, negatively impacting patients' quality of life. Considering this scenario, it is extremely important to research new bioactive molecules for use in antitumor treatment, such as curcumin (CUR), which acts by inducing apoptosis in cancer cells. However, it has low aqueous solubility, which makes its use difficult. To solve this problem, a strategic alternative is its incorporation into liquid crystalline systems (LCSs) for vaginal administration, since this route is extremely useful when a local effect of the drug is desired, avoiding first-pass metabolism. LCSs have the ability to control drug release, as well as potentiate its action, resulting in increased tumor concentration and reduced normal tissue damage. In this system it is still possible to add polymers such as chitosan (CS) and polyethyleneimine (PEI), which contribute to the increase of viscosity and to the increase of the contact time of the formulation with the vaginal mucosa. The objective of this work is to develop LCSs composed of ethoxylated ethoxylated 20 alcohol and propoxylated 5, oleic acid and aqueous phase containing water (FW) or polyethyleneimine-associated chitosan dispersion (FPC) for vaginal administration of CUR and characterizing them using polarized light microscopy (PLM), small-angle X-ray scattering (SAXS), rheology, texture profile and mucoadhesion studies and perform in vitro release, permeation and retention studies, cytotoxicity assay and verify vascular changes in the chorioallantoic membrane model of embryo chicken (CAM). PLM and SAXS results revealed that the FPC formulation had lamellar phase. The rheology showed that the FPC and FW formulations showed pseudoplastic behavior and thixotropy and FPC showed better mechanical and mucoadhesive properties, whose performance is desirable for topical formulations. FPC released 7.79% CUR and FW released 7.04% in 12 hours, acting as sustained release systems and both systems retained around 2.3% CUR in the vaginal mucosa. The formulations showed biocompatibility with L929 cells and toxicity to Hela cells. Finally, it was possible to observe a decrease in the caliber and the number of vessels in the CAM after the application of FPC. Therefore, considering the results obtained, it can be concluded that the developed systems presented interesting characteristics for the treatment of cervical cancer.

Key words: pharmaceutical nanotechnology, liquid-crystalline systems, mucoadhesion, curcumin, vaginal administration, cervical cancer.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Câncer

Câncer é um grupo de doenças que têm em comum o crescimento anormal das células e foi responsável por aproximadamente 9,6 milhões de mortes em 2018, sendo considerado a segunda maior causa de morte no mundo (Bray et al. 2018; Siegel et al., 2019).

Essa doença se origina da quebra do ciclo de vida natural das células saudáveis, tornando-se células anormais, que começam a se dividir muito rapidamente e sem controle. Além disso, essas células anormais podem se espalhar para os tecidos circundantes ou invadir outros órgãos, originando uma doença metastática (SEYFRIED et al., 2010; ANAND et al., 2008).

O câncer mais frequente entre as mulheres é o câncer de mama, colorretal, pulmão, colo do útero e estômago, enquanto entre os homens é o câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado (Bray et al. 2018; Siegel and Miller, 2019). Suas causas externas podem corresponder a fatores ambientais, como tabagismo, alcoolismo, radiação, sobrepeso e obesidade, baixa ingestão de frutas e vegetais e transmissão sexual do papilomavírus humano para câncer do colo do útero. Enquanto as causas internas são congênitas, por exemplo, a mutação genética herdada dos pais (ALEXANDROV et al., 2013; DANAIE et al., 2005; LOCK et al., 2005; JAMES et al., 2004; LOCK et al., 2004; EZZATI et al., 2004; REHM et al., 2004; SLAYMAKER et al., 2004, JOSEFSON, 2001; BERGSTROM et al., 2001; PETO, 2001; PETO et al., 2000; HUSSAIN, 2003; FRANK, 2009).

Algumas mudanças na fisiologia celular são comumente identificadas no desenvolvimento da maioria dos cânceres como autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, apoptose, potencial replicativo ilimitado, vascularização sustentada (angiogênese) e invasão tecidual e metástase (SEYFRIED et al., 2010; HANAHAN et al., 2000).

A insensibilidade ao inibidor do crescimento, mediada principalmente pelas proteínas supressoras de tumor e a invasão tecidual são os dois principais obstáculos que devem ser superados para que as células cancerígenas não adquiram limites à proliferação. Além disso, a angiogênese é um processo igualmente importante a ser superado, pois ocorre quando as células cancerígenas secretam fatores de crescimento e citocinas capazes de promover a formação de novos vasos sanguíneos, a fim de crescer e garantir um suprimento adequado de nutrientes e oxigênio (ABDEL-HAMID et al., 2018)

Entre os fatores de crescimento angiogênico e citocinas mais bem documentados, estão incluídos os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de

fibroblastos (FGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), TGF- β e angiopoietinas (Angs) (ABDEL-HAMID et al., 2018; JAYANTHI et al., 2017; WANG et al., 2015; CARMELIET, 2005).

Além disso, o desequilíbrio da sinalização pró e anti-angiogênica e o desenvolvimento de uma rede vascular anormal caracterizada por canais dilatados, tortuosos e saculares com padrões aleatórios de interconexão e ramificação ocorrem na angiogênese (KOBAYASHI et al., 2014; SHI et al., 2013; NAGY et al., 2010; JAIN, 2005; BALUK et al., 2005). Isso resulta em um microambiente tumoral hostil, caracterizado por hipóxia, baixo pH e alta pressão do líquido intersticial, o que contribui para o processo de metástase e dificulta a função das células imunes (HUANG et al., 2015; JAIN, 2005).

1.2.Câncer Cervical

O câncer cervical é o terceiro câncer mais comum que afeta as mulheres (FREITAS et al., 2014), é responsável por 570 mil novos casos e, mais do que qualquer outro tumor ginecológico, causa 311 mil mortes em todo o mundo a cada ano (WHO, 2019), representando um grande problema de saúde pública.

1.2.1. Fisiopatologia

Este câncer tem início nas células glandulares e escamosas do colo do útero. Todavia, antes destas se tornarem células cancerígenas, elas passam pela fase de pré-câncer, onde é possível o tratamento e prevenção do desenvolvimento do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). Mulheres no estágio inicial deste câncer ou no estágio pré-câncer normalmente não apresentam sintomas. Já nos estágios mais avançados da doença os sintomas mais comumente são hemorragia vaginal anormal, como sangramento após sexo vaginal, sangramento após menopausa, períodos menstruais mais longos com sangramentos mais intensos do que o habitual e dor durante o sexo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

Vários são os fatores que colaboram para o desenvolvimento do câncer cervical, entre eles o comportamento sexual das mulheres, alto número de paridade, tabagismo, uso prolongado de contraceptivo oral, susceptibilidade genética, infecção por *Chlamydia trachomatis*, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, principalmente, pelo papilomavírus humano (HPV) (FRANCO et al., 2001; WHO, 2019; HOLCOMB et al., 2005), sendo que 95% dos casos são causados por infecções persistentes com HPV (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2017).

Os tipos de HPV genital são subdivididos em tipos de baixo risco oncongênico, que causam

principalmente as verrugas genitais e tipos de alto risco oncogênico, frequentemente associados ao câncer cervical invasivo. Os tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 são classificados como de alto risco (FRANCO et al, 2001; MUÑOZ et al, 2003). O HPV produz as proteínas E6 e E7 que são responsáveis por interagir e alterar ou destruir genes supressores de tumor, e é a capacidade dessas proteínas que define o potencial carcinogênico do vírus (BOSCH et al., 2002).

A infecção ocorre quando os virions de HPV entram em contato com as células basais e parabasais e o DNA viral entra no núcleo das células. A fixação do vírus está relacionada à atividade proliferativa das células epiteliais e, no caso de reparo tecidual extensivo, a infecção viral pode se disseminar. Infecções por tipos de HPV de baixo risco apresentam duração curta, enquanto a infecção pela maioria dos tipos de alto risco dura um período maior. Essas infecções podem se tornar persistentes, o que torna propício o desenvolvimento do câncer (BOSCH et al., 2002).

O câncer cervical apresenta algumas classificações de acordo com o grau de infecção do HPV, que varia do estágio 0 ao 4. Quando as células anormais estão na parte mais interna do colo do útero, o câncer cervical se encontra no estágio 0 (pré-canceroso), conhecido também como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) (AIDÉ et al., 2009). No estágio 1 as células tumorais invadem o colo do útero, mas não se espalha para outros órgãos; no estágio 2, o câncer não está mais limitado ao colo do útero, mas ainda se restringe à região pélvica; no estágio 3 o câncer se espalha para a parte inferior da vagina ou para a parede pélvica e pode obstruir os ureteres, canais que levam a urina dos rins para a bexiga (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). O estágio 4 é uma neoplasia maligna na qual as células tumorais podem se espalhar para outros órgãos como bexiga e pulmões (AIDÉ et al., 2009).

1.2.2. Prevenção

O uso de preservativo, a vacina contra HPV e o exame de Papanicolaou são alguns métodos de prevenção deste câncer, sendo o exame importante também para o seu diagnóstico precoce (FRUMOVITZ et al., 2005). Em muitos países desenvolvidos, a incidência de câncer cervical invasivo diminuiu, em virtude justamente da detecção precoce da doença. No entanto, esses métodos de prevenção muitas vezes não estão ao alcance de todas as mulheres, principalmente, as de baixa renda, que muitas vezes não têm acesso a esses recursos. Com isso, o câncer cervical normalmente é detectado em seu estágio avançado, tornando-se o tratamento mais agressivo necessário (AUSTIN et al., 2002; INCA, 2017).

1.2.3. Tratamento do Câncer Cervical

O câncer cervical pode ser tratado com cirurgia, radioterapia ou radioquimioterapia, todos impactando negativamente na qualidade de vida da mulher, pois causam muitos efeitos colaterais, como náusea, vômitos, perda de cabelo, imunossupressão e frequentemente com prognóstico desfavorável (GREIMEL et al., 2009; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2017; INCA, 2017; RAVAL et al., 2012; SHANHOLTZ et al., 2001; SZAKÁCS et al., 2006; VAN MEIR et al., 2017; WANG et al., 2010b).

Além disso, o alto custo do tratamento e o desenvolvimento de resistência aos medicamentos também são dificuldades para o sucesso do tratamento. Portanto, explorar o desenvolvimento do sistema de administração de fármacos com novas tecnologias, como a nanotecnologia, é uma alternativa promissora para superar esses desafios.

Tendo em vista esse cenário, é de extrema importância a pesquisa de novas moléculas bioativas para uso na terapia antitumoral, bem como a utilização de vias alternativas para administração dos fármacos empregados no tratamento.

1.3. Curcumina

A curcumina (CUR), também conhecida como 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona, é um produto natural isolado dos rizomas da planta de *Curcuma longa* e apresenta um pigmento intensamente amarelo (SHARMA et al., 2005). Conforme fórmula estrutural apresentada na Figura 1, a curcumina é um composto polifenólico, apresenta duas porções de ácido ferúlico ligadas entre si com um carbono adicional (metano) para reduzir os grupos carboxila e possui um ligante de sete carbonos (IQBAL et al., 2003).

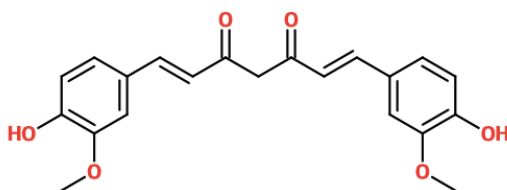


Figura 1. Estrutura da Curcumina.

Há séculos a CUR tem sido utilizada, principalmente na Ásia, na culinária devido ao seu sabor e cor e na medicina. Já no Ocidente não faz muito tempo que a importância da CUR foi reconhecida (FAROOQUI et al., 2019). Este fármaco apresenta propriedades analgésicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antifúngicas, antidiabéticas, anti-hipertensiva, antihepatotóxica, antipsoríase, antiproliferativas, antiangiogênicas, anticancerígenas

(SALMAZI et al., 2015; FAROOQUI et al., 2019), podendo agir como quimiopreventivo e terapêutico contra vários tipos de câncer como de mama, cervical, intestino, hepático, ovário, pancreático e próstata.

Diferentemente de vários fármacos disponíveis comercialmente, acredita-se que a curcumina apresente menos efeitos colaterais importantes. Em ensaios clínicos em humanos, nenhuma toxicidade limitante da dose (nenhum aumento de efeitos adversos sobre o placebo) foi relatada quando administrada em doses de até 12 g / dia, demonstrando que a curcumina apresenta extrema segurança (AGGARWAL et al., 2003; CHAINANI-WU et al., 2003; LAO et al., 2006).

Uma característica muito interessante da CUR é que ela é capaz de proteger as células saudáveis, devido, em parte, à sua alta capacidade antioxidante, enquanto induz apoptose em células cancerígenas (CHEN et al., 2016; DUVOIX et al., 2005; KUNNUMAKKARA et al., 2008). A CUR pode causar apoptose por diferentes mecanismos como: a) causando a diminuição rápida do potencial da membrana mitocondrial, que leva à liberação do citocromo C e ativa algumas caspases, como a 3 e 9, proteases que levam a morte celular (CHATTOPADHYAY, 2004); b) reduzindo a expressão do gene antiapoptótico, como o Bcl-xL e Bcl-2 (JAGTAP et al., 2009); c) ativando a p53, proteína supressora de tumores que pode levar à permeabilidade da membrana mitocondrial e à liberação de proteínas pró-apoptóticas no citosol, como a Bax e BID, causando a apoptose (SHEHZAD et al., 2013; AGGARWAL et al., 2003).

Divya e colaboradores (2006) analisaram as propriedades antitumorais e antivirais da CUR em células de câncer cervical associadas ao HPV e concluíram que esta substância é capaz de induzir a apoptose em células de câncer de colo do útero. Roy e colaboradores (2014) mostraram em seu estudo que a CUR induziu a acetilação da proteína p53 nas células cervical (SiHa). Singh e colaboradores (2009) identificaram que a apoptose mediada pela CUR nas células HeLa e SiHa é devido à ativação da proteína Bax pró- apoptótica, liberação do citocromo C e inibição das proteínas Bcl-xl e Bcl-2 anti-apoptótico. Além disso, o estudo mostrou que houve um aumento na atividade das caspases-3 e -9, sugerindo o papel da mitocôndria na morte celular apoptótica mediada por CUR.

Além disso, esta molécula bioativa é um inibidor das metaloproteínases da matriz (MMPs) tipo 2 e 9, que são endopeptidases contendo zinco, que degradam os componentes da matriz extracelular basal pela clivagem das ligações peptídicas (LEE et al., 2015; KOIVUNEN et al., 1999).

Estas MMPS estão relacionadas ao crescimento tumoral uma vez que são produzidas em excesso pelas células tumorais, causando a degradação dos tecidos periféricos, resultando em proliferação, invasão e desenvolvimento de novos tumores (BREMER et al., 2001; EGEBLAD et al., 2002). Além disso, as MMPs também influenciam a angiogenese patológica, que é um processo na qual as células em hipóxia secretam fatores angiogênicos como VEGFs (fatores de crescimento endotelial vascular), que estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos, levando ao crescimento tumoral (NAVARRO et al., 2006; KESSENBROCK et al., 2015).

A CUR apresenta baixo peso molecular (368,37 g / mol), temperatura de fusão de aproximadamente 183 C (FAROOQUI et al., 2019), baixa solubilidade em água, solubilidade moderada em hexano, ciclo-hexano, tetra-hidrofurano e dioxano e é facilmente solúvel em solventes orgânicos, incluindo etanol, metanol, isopropanol, acetona e dimetilsulfóxido.46,47 (FAROOQUI et al., 2019). Além disso, é uma molécula altamente lipofílica (log P 3.6) que percorre rapidamente a membrana celular e não é tóxica para células normais (GHALANDARLAKI et al., 2014; YOUSEF et al., 2019), porém sua aplicação clínica é limitada uma vez que apresenta pouca solubilidade em água, baixa meia-vida e instabilidade química, o que diminui a sua biodisponibilidade (GHALANDARLAKI et al., 2014; SUN et al., 2012; AHMAD et al., 2015).

A CUR se degrada mais rapidamente em pH fisiológico ou maior, indicando que sua decomposição depende do pH (WANG et al., 1997; TØNNESEN et al., 1986). A vanilina, o ácido ferúlico e o diferloilmetano são os principais produtos de degradação (MARTINEZ-GUERRA et al., 2019). Tønnesen e Karlsen (1985) mostraram que a curcumina degrada no intervalo de pH de 7 a 10, o que os levou a manter o pH de trabalho abaixo de 7 para garantir a estabilidade. Além disso, Wang et al. (1997) estudaram a degradação da curcumina em diferentes sistemas tampão (citratos, fosfatos e carbonatos) a 0,1 M e relataram o aumento da estabilidade da curcumina ao pH ácido em meio aquoso.

Além da sua instabilidade em pH acima de 7 a curcumina é sensível à luz e descolora rapidamente com a exposição à luz (TØNNESEN et al., 1986; FAROOQUI et al., 2019) portanto, o seu manuseio deve ser realizado na ausência da luz ou sob luzes do tipo âmbar ou amarela, uma vez que estas apresentam espectro de irradiação luminosa que não leva à fotodegradação de substâncias (TØNNESEN, 2004).

Assim, uma estratégia para viabilizar sua utilização é a sua incorporação em sistemas de liberação de fármacos, como sistemas líquido-cristalinos (SLCs) para administração vaginal.

1.4. Via de administração vaginal

O interesse em sistemas de liberação vaginal tem sido explorado muito nos últimos anos, uma vez que é uma via não invasiva e pode ser uma via alternativa para administração de fármacos que são poucos absorvidos oralmente (HUSSAIN et al., 2005).

A via vaginal é uma via de administração de fármacos que apresenta grandes vantagens como: (i) recuperação rápida após o estresse ou dano; (ii) grande fornecimento de sangue; (iii) ausência do efeito de primeira passagem que evita o metabolismo pré-sistêmico do fármaco pelo trato gastrointestinal (SILVA et al., 2014; YANG et al., 2014). Porém, esta via pode também apresentar características desfavoráveis como a secreção de fluídos, o que contribui para a remoção fácil da formulação, exigindo um maior número de aplicações em um intervalo de tempo menor (FRANK et al., 2014, VALENTA et al., 2005; DAS NEVES et al., 2008; WONG et al., 2014; EL-HAMMADI; ARIAS, 2016).

1.5. Nanotecnologia Farmacêutica

Desta forma, torna-se necessário o uso de sistemas de liberação de fármacos com características mucoadesivas para superar os desafios supracitados da via vaginal, pois esses sistemas conseguem proteger os quimioterápicos contra a degradação físico-química, aumentar seu tempo de contato com o ambiente vaginal e controlar a sua liberação (KANG et al., 2009; EL-HAMMADI; ARIAS, 2016), de forma a possibilitar um tratamento local, adequado e promissor do câncer cervical, além de ser uma opção para o tratamento convencional cirúrgico deste câncer (ZONG et al., 2015).

Estudos relataram que vários sistemas de liberação de fármacos inovadores para terapia anticâncer podem ser projetados com sucesso, entre eles microcápsulas (COLONE et al., 2016), microesferas (GUPTA; HUNG, 1990), hidrogéis de polímeros (FERREIRA et al., 2017a; FERREIRA et al., 2017b; GUPTA et al., 2002; LI et al., 2015), lipossomas (KONO et al., 2010; MALAM et al., 2009; PARK, 2002), micelas de polímero (MATSUMURA; KATAOKA, 2009; NASONGKLA et al., 2006; RAPOPORT, 2007, nanoemulsões (FANG et al., 2009; KHATRI et al., 2013), nanopartículas (HUANG et al., 2011; LIU et al., 2013), cristais líquidos (CALIXTO et al., 2018; LECHUGA-BALLESTEROS et al., 2003; VICTORELLI et al., 2018), entre outros.

Um dos principais objetivos desses sistemas é controlar as taxas de liberação de fármacos para órgãos e tecidos específicos (ANSEL et al., 2000; BASIT, 2005; PEZZINI et al., 2007). Esses sistemas podem manter as concentrações plasmáticas de fármacos estáveis por um longo

período, garantindo um efeito terapêutico por um período prolongado. Consequentemente, a frequência de administração de fármacos pode ser reduzida, melhorando a adesão do paciente ao tratamento (BRUNO et al., 2013; IBRAHEEM et al., 2014; JAIN et al., 2013; MAIOR et al., 2008; RICCI et al., 2005; SINHA; KUMRIA, 2001; SINHA; TREHAN, 2003).

O uso de nanocarreadores é muito relevante no tratamento de câncer pois: possibilitam aumentar a concentração de fármacos no tumor; diminuir a concentração de fármacos no tecido normal; melhorar os perfis de farmacocinética, farmacodinâmica e solubilidade do fármaco, como a curcumina; liberar o máximo de fármaco no local desejado, diminuindo a toxicidade sistêmica; aumentar a estabilidade de fármacos; aumentar a especificidade, reduzindo os danos do tecido normal; e melhorar a internalização e a entrega intracelular (DANHIER et al., 2010).

Normalmente, os vasos sanguíneos tumorais são caracterizados por anormalidades, tais como altas proporções de células endoteliais em proliferação e formação de membrana basal defeituosa levando a uma maior permeabilidade vascular. Este ambiente possibilita que os nanocarreadores consigam entrar e se acumular dentro do espaço intersticial. Além disso, os vasos linfáticos estão ausentes ou não funcionais no tumor, o que contribui para a drenagem ineficiente do fármaco do tecido tumoral. Este efeito de permeabilidade e retenção aumentada é chamado de “Efeito Enhanced Permeability and Retention” (EPR) (DANHIER et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2014; YANG et al., 2010; TORCHILIN et al., 2011; GREISH et al., 2012).

1.5.1. Sistemas líquido-cristalinos

Dentre os sistemas nanoestruturados, os sistemas líquidos cristalinos (SLCs), também conhecidos como mesofases liotrópicas, vêm sendo muito estudados por nosso grupo de pesquisa, inclusive para a administração de fármacos via vaginal (RAMOS et al., 2015; SALMAZI et al., 2015; RAMOS et al., 2016).

Os sistemas líquido-cristalinos podem ser considerados micelas ordenadas com arranjo molecular contendo regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas (GABBOUN et al., 2001; FORMARIZ et al., 2005). Os cristais líquidos combinam as propriedades de um cristal sólido com as de um líquido isotrópico, podendo proteger os fármacos e possibilitar a sua liberação controlada (SALMAZI et al., 2015; BERNEGOSI et al., 2016; CHORILLI et al., 2016; CALIXTO et al., 2016, CINTRA et al., 2016).

Para o desenvolvimento dos SLCs é necessário no mínimo um componente anfifílico, como por exemplo, ácido graxo, tensoativo e seu solvente, como por exemplo a água (FORMARIZ et al., 2005; HYDE 2001; MEZZENGA et al., 2019). Com isso, de acordo com os componentes

utilizados e as proporções utilizadas o sistema líquido cristalino irá se estruturar em uma determinada mesofase (VICTORELLI et al., 2018; FONSECA-SANTOS et al., 2016; RODERO et al., 2018)

1.5.1.1. Mesofases

Os SLCs podem apresentar as mesofases lamelar, hexagonal e cúbica, como ilustrado na Figura 2 (CALIXTO et al., 2017).

A mesofase lamelar (Figura 2a) é considerada a fase mais simples do SLC, apresenta bicamadas lipídicas separadas por fase aquosas, formando uma estrutura unidimensional paralela (GOSENCA et al., 2013; MUELLER- GOYMANN, 2004).

et al., 2018). A mesofase hexagonal é formada por estruturas bidimensionais cilíndricas hexagonais e podem se organizar em fases normais ou reversas. Na mesofase hexagonal normal (Figura 2b.1) os grupos polares do lipídio estão voltados para o interior do cilindro, já na mesofase hexagonal reversa (Figura 2b.2) estas mesmas cadeias polares estão voltadas para o lado exterior do cilindro (MUELLER- GOYMANN, 2004; SHAH et al., 2001).

Já a estrutura da mesofase cúbica compreende uma bicamada lipídica bicontinua curva que se estende em três dimensões sendo separadas por canais de fase aquosa e, portanto, formando uma estrutura tridimensional (GUO et al., 2010).

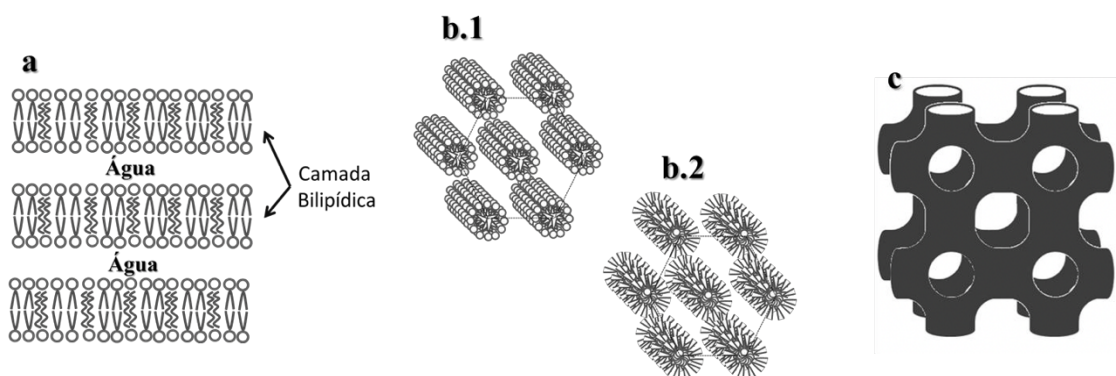


Figura 2. Representação das diferentes fases líquido cristalinas: a. Fase lamelar; b.1. Fase hexagonal normal; b.2. Fase hexagonal reversa; c. Fase cúbica. Fonte: Noboru et al., 2018.

As mesofases líquido-cristalinas podem ser caracterizadas verificando-se a viscosidade das formulações. Os cristais líquidos de fase lamelar geralmente apresentam-se como líquido viscoso, os de fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel, já a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada (GABBOUN et al., 2001; HYDE, 2001; FORMARIZ et al., 2005). Porém, para confirmar a formação do sistema e a mesofase é necessário realizar o espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

1.5.1.2. Ácido Oleico

Entre os componentes possíveis para a formação da fase oleosa dos sistemas líquido cristalinos estão os ácidos graxos (MEZZENGA et al., 2019). Os ácidos graxos são substâncias orgânicas encontradas em temperatura ambiente nas fases sólida, líquida e semissólida. Eles podem ser classificados como essenciais que são aqueles que não são sintetizados pelo homem e indispensáveis ao desenvolvimento e à saúde e os não essenciais, que são os produzidos pelo homem.

Nesse contexto, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) são classificados como essenciais, enquanto os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) são classificados como não essenciais (MILES et al., 1998). A classificação de ácidos graxos em MUFA ou PUFA é baseada nas ligações de hidrocarbonetos em sua composição estrutural. Quando um ácido graxo não possui ligações duplas na cadeia de hidrocarbonetos, é denominado ácido graxo saturado (SFA) e, quando possui uma ou mais ligações duplas, é classificado como MUFA ou PUFA, respectivamente (GUNSTONE et al., 1994; HORNSTRA et al., 1982).

Portanto, de acordo com a Figura 3 o ácido oleico (AO) é um MUFA, um ácido graxo não essencial que foi recentemente descrito como um regulador da função imunológica e da saúde.

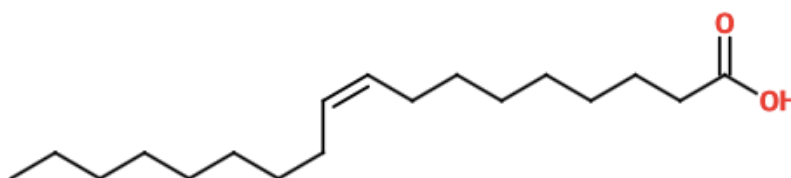


Figura 3. Estrutura do Ácido Oleico.

MUFA contribuem para o consumo de gordura na dieta em muitas partes do mundo e na região do Mediterrâneo constituem pelo menos um terço da ingestão total de ácidos graxos (YAQOOB, 2002). Nos últimos anos, muitos estudos descreveram as vantagens de alguns alimentos com alto teor de AO para a saúde geral (JOSSA et al., 1996; TSIMIKAS et al., 1998; PANAGIOTAKOS et al., 2009; TERES et al., 2008; BERSAMIN et al., 2008; LARDINOIS et al., 1987; MULVAD et al., 1996), que demonstraram reduzir os níveis de colesterol, pressão arterial, risco de aterosclerose (MILES et al., 1998; DROSOS et al., 1995; BESLER et al., 1995; YAQOOB et al., 1998; MULROONEY et al., 1993). Além disso, o AO também demonstrou efeitos anti-inflamatórios benéficos em doenças autoimunes (LINOS et al., 1991; KREMER et

al., 1990), ser potencializador na absorção de drogas, ter ação bactericida e fungicida, inibir a proliferação do câncer e expressão de oncogenes e melhorar a função do sistema imunológico (LIPWORTH et al., 1997; ASSMANN et al., 1997; MARTIN-MORENO et al., 1994; SIMONSEN et al., 1998; SOLANAS et al., 2002; SALES-CAMPOS et al., 2013).

1.5.1.3. Álcool cetílico etoxilado 20 e propoxilado 5 (Procetyl® AWS)

Outro componente interessante para a formação dos SLCs em conjunto com o ácido oleico é o Procetyl® AWS, que é um tensoativo (VICTORELLI et al., 2018).

Os tensoativos são substâncias capazes de diminuir a tensão superficial entre uma fase aquosa e oleosa permitindo que elas se misturem. Portanto, um tensoativo deve ter uma estrutura química com dois grupos funcionais diferentes, com diferentes afinidades na mesma molécula, o grupo hidrofóbico, que não mostra afinidade com a água e o grupo hidrofílico que tem afinidade com a água. Esse tipo de estrutura com duas funções opostas é chamado de estrutura anfifílica (NUKAMA, 2017).

Os tensoativos são classificados em iônicos e não-iônicos. Os tensoativos iônicos são subclassificados em aniônicos, onde o grupo hidrofílico se dissocia em ânions em soluções aquosas, catiônicos que se dissociam em cátions e anfotéricos que se dissociam em ânions e cátions, geralmente dependendo do pH. Os tensoativos não iônicos não se dissociam em íons em soluções aquosas (NUKAMA, 2017).

O Procetyl® AWS é um tensoativo líquido não iônico solúvel em álcool e água e estável em pH alto e baixo (CRODA, 2010). De acordo com a Figura 4, esse tensoativo apresenta uma porção etoxilada e uma unidade de polipropileno. Ele apresenta características emoliente, solubilizante, umectante, plastificante, emulsificador e umectante em diferentes formulações (CRODA, 2010).

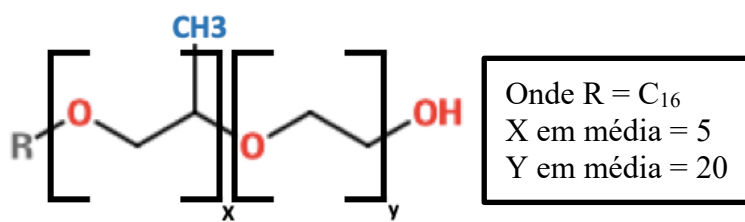


Figura 4. Estrutura de um álcool graxo etoxilado e propoxilado (PPG-5-Ceteth 20).

Portanto, no desenvolvimento do sistema líquido cristalino o Procetyl® AWS permite que a fase oleosa e a fase aquosa se misturem possibilitando a formação do sistema em questão.

1.5.1.4. Polímeros

Além das propriedades já mencionadas, SLCs permitem a incorporação de polímeros catiônicos, como a quitosana (QS) e polietilenoimina (PEI), que podem aumentar o tempo de permanência da formulação no ambiente vaginal e a absorção celular do fármaco (KAST et al., 2002; NEVES et al., 2011; GÜNTHER et al., 2011).

1.5.1.4.1. Quitosana (QS)

A QS apresenta-se na forma desacetilada da quitina e é um polissacarídeo catiônico composto por unidades de $\alpha(1-4)$ -2-amino-2-deoxi β -D-glucana, representada na Figura 5. QS apresenta baixa citotoxicidade, é biodegradável e biocompatível e tem sido empregada em sistemas de liberação para via vaginal (FRANK et al., 2014; JERE et al., 2009).

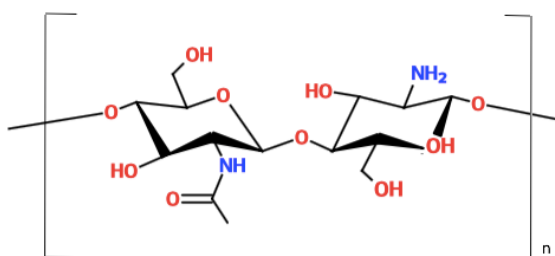


Figura 5. Estrutura da quitosana.

A QS apresenta diversas características favoráveis: é capaz de controlar a liberação de fármacos; evita o uso de solventes orgânicos perigosos, uma vez que é solúvel em solução ácida aquosa (AGNIHOTRI et al., 2004); possui caráter adesivo, o que aumenta o tempo de contato no local de aplicação (BERNKOP-SCHNURCH et al., 2012), é um excipiente seguro (DASHA et al., 2011), é capaz de intensificar a penetração de fármacos ao abrir junções epiteliais (SCHIPPER et al., 1997; ILLUM et al., 2001) e também apresenta carga positiva, que permite que o QS interaja com polímeros, macromoléculas e poliânions com carga negativa (PRABAHARAN et al., 2008; CALIXTO et al., 2019).

Além disso, a QS também apresenta várias propriedades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, analgésicas, hemostáticas, hipocolesterolêmicas e antioxidantes (KUMAR, 2000; KUMAR et al., 2004; KOIDE, 1998), sendo útil para o tratamento de várias doenças.

Portanto, o seu uso é extremamente interessante para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos principalmente em formulações muco ou bioadesivas (DASHA et al., 2011; PRABAHARAN et al., 2008; CHATELET et al., 2001)

1.5.1.4.2. Polietilenoimina (PEI)

PEI é um polímero que contém amina multifuncional solúvel em água que contém grupos básicos amina (GÜNTHER et al., 2011), como ilustrada na Figura 6. Portanto, ambos os polímeros apresentam alta densidade de carga catiônica, assim, podendo aumentar a interação por forças de atração da formulação com as superfícies carregadas negativamente, como o muco vaginal (GÜNTHER et al., 2011; GHALANDARLAKI et al., 2014; FRANK et al., 2014). A PEI também tem a capacidade de intumescer em presença de água, formando um gel o que contribui para uma melhor adesão da formulação no local de aplicação (ROWE et al., 2003). Além disso, a PEI pode promover *uptake celular* de várias moléculas, pois este polímero é capaz de exercer interação com as proteínas extracelulares de membrana de células tumorais por forças de atração, uma vez que estas apresentam carga negativa, devido à alta expressão de fosfolípido aniônico, conhecido como fosfatidilserina (JERE et al., 2009, CALIXTO et al., 2017).

A PEI também apresenta uma elevada densidade eletrônica, pois os grupos amino estão parcialmente protonados em pH fisiológico e isso pode contribuir para o condensamento do DNA (poliplexos) e simplificação da sua saída do endossoma. Deste modo, após a internalização nas células, os prótons que são liberados por meio do método de acidificação dos endossomas são adquiridas pelos grupos aminas da PEI, impossibilitando a diminuição do pH endossomal. Assim, a entrada de prótons e a saída de íons cloreto continuam a suceder, e este processo provoca o influxo de água, resultando em uma turgidez osmótica e consequentemente lise da membrana endossomal. Desta forma, os poliplexos são liberados para o citosol (BENJAMINSEN et al., 2013; RADAIC et al., 2016). Devido a esta característica, a PEI também é frequentemente estudada para a transfecção celular de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou de ácido ribonucleico (RNA) com foco na terapia gênica.

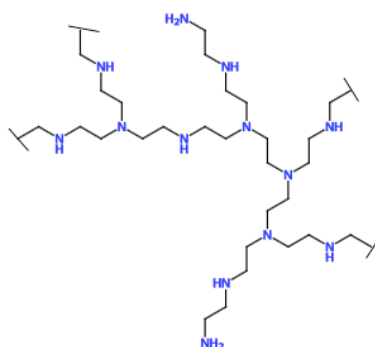


Figura 6. Estrutura de um segmento de PEI.

Portanto, tendo em vista o cenário atual desvantajoso em relação às modalidades

terapêuticas convencionais para o tratamento do câncer cervical, acredita-se que a incorporação de CUR em SLCs possa ser uma ferramenta nanobiotecnológica promissora para o tratamento do câncer cervical.

1.6. Ensaio *in vivo* alternativo: modelo de membrana corioalantóica em ovos de galinha (CAM)

A membrana corioalantóica em ovos de galinha (CAM) é uma membrana extraembrionária de dupla camada transparente e é composta por capilares, artérias e veias ligadas à circulação embrionária, sendo considerada um tecido completo (PRICE et al., 1986; VALDES et al., 2002; VARGAS et al., 2007). Os vasos sanguíneos imaturos presentes no mesoderma crescem muito rapidamente, apresentando uma proliferação capilar acelerada até o dia 11 do desenvolvimento. Por volta do dia 14, o plexo capilar fica na superfície do ectoderma adjacente à membrana da concha. Após, esse processo reduz e o sistema vascular atinge o seu formato final, pouco antes do nascimento do filhote, o que ocorre depois de 21 dias de desenvolvimento (RIBATTI et al., 2001; AUSPRUNK et al., 1974).

Devido à sua extensa vascularização e fácil manipulação, a CAM é um modelo que pode ser comparada a um sistema *in vivo* intermediário e tem sido amplamente utilizado como um instrumento de pesquisa *in vivo* para avaliar a atividade de fármacos angiogênicos e antiangiogênicos (YUAN et al., 2014; PEEK et al., 1988). Este modelo fornece um tecido completo capaz de responder efetivamente à lesões com reações inflamatórias clássicas e conhecidas, sem o embrião de galinha sentir dor, já que a inervação sensorial não foi desenvolvida nos estágios iniciais, até o décimo quarto dia do desenvolvimento embrionário. Por isso, em alguns países, o procedimento experimental é permitido sem a autorização de comitês de experimentação animal (por exemplo, Estados Unidos da América (EUA), União Européia e Suíça) desde que estes sejam realizados nesse intervalo de tempo (LEIGHTON et al., 1985). No entanto, no Brasil, por se tratar de um animal cordado, ainda é preciso aprovação de Comitê de Ética, de acordo com a lei Arouca.

Durante o desenvolvimento embrionário, ocorrem dois processos vasculares: a vasculogênese e a angiogênese. O primeiro processo está relacionado à formação de vasos sanguíneos devido à diferenciação de células precursoras angioblásticas. Já o último implica na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e tem sido amplamente explorado, uma vez que várias doenças estão associadas à angiogênese anormal (RIBATTI,

2001; DERYUGINA; QUIGLEY, 2008). Por exemplo, o desenvolvimento de um tumor depende da angiogênese, especialmente em casos malignos, onde são detectadas metástases (FOLKMAN, 1971). O processo compreende uma série de eventos, como migração e invasão celular através da matriz extracelular, proliferação e diferenciação celular e também interações celulares, resultando na formação de estruturas multicelulares em resposta a mediadores químicos secretados (NAGY et al., 2007; ZEITLIN et al. 2012).

Diversos são os fatores envolvidos na angiogênese. Por exemplo, as isoformas de proteínas do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenham um papel importante no processo angiogênico em condições fisiológicas e terapêuticas. No entanto, é mostrado que o aumento da expressão de VEGF está relacionado à progressão de vários cânceres (FERRARA et al., 2003). A família VEGF compreende seis classes de glicoproteínas conhecidas como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF e VEGF-E. A angiogênese é governada principalmente pela ligação do VEGF-A aos seus receptores de tirosina-quinase Flt-1 (VEGFR1) e KDR (VEGFR2) encontrados predominantemente na superfície das células endoteliais (FERRARA et al., 2004).

Exemplos dos ensaios disponíveis para estudar o processo angiogênico utilizando modelos *in vivo* incluem a bolsa das bochechas de hamster, a pele dorsal de roedores e o saco aéreo, córnea avascular e íris do olho de roedor (FEDERMAN et al., 1980; LI et al., 2000; TAGAMI et al., 2012; WANG et al., 2008; ZICHE, 2001). Embora esses modelos continuem sendo amplamente explorados para uso clínico, seu uso ainda é demorado e difícil de executar e avaliar (FESTING; WILKINSON, 2007). O crescente interesse na CAM como modelo de pesquisa biológica e farmacêutica no estudo da angiogênese baseia-se em sua vantagem de ser mais simples em comparação com outros modelos (RIBATTI et al., 1996; VARGAS et al., 2007) e fornecer um desempenho de formulação mais relevante que os testes *in vitro* (VARGAS et al., 2007). Além disso, este modelo pode contribuir para o programa 3Rs, nomeado em função de seus principais objetivos, que são a substituição, redução e aprimoramento dos testes em animais, a fim de reduzir o número de animais utilizados nas pesquisas e seus sofrimentos e, finalmente, buscar métodos alternativos para substituir os testes *in vivo* usuais (BRASIL, 2016). Outra vantagem importante é que os ovos férteis são baratos e não requerem condições rigorosas, como instalações para animais (LEIGHTON et al., 1985). Portanto, esse modelo tornou-se uma ferramenta de bio-pesquisa cientificamente aceitável e vantajosa (PRICE et al., 1986).

A eficácia de sistemas que contêm fármacos antiangiogênicos através do uso do modelo CAM consiste em um ensaio simples avaliado por observação direta dos efeitos causados, como oclusão dos vasos, hemorragias, lise vascular, coagulação, fragmentação dos vasos ou mesmo número de vasos sanguíneos (VARGAS et al., 2007). Por outro lado, fármacos proangiogênicos podem aumentar o número de vasos sanguíneos observados, causar dilatação do diâmetro ou aumento do comprimento de vasos menores. Portanto, este modelo é uma ferramenta interessante para avaliar o desempenho de diferentes tipos de sistemas de liberação de fármaco e diversos trabalhos na literatura resumem as diferentes aplicações do referido modelo.

Da-Lozzo e colaboradores (2013) utilizaram o modelo CAM para avaliar hidrogéis de xantano-galactomanano carregados com curcumina. Eles não verificaram neovascularização ou fibrose tecidual após o implante de hidrogel, o que não causou nenhum tipo de lesão tecidual na CAM, demonstrando biocompatibilidade dos sistemas.

Baghdan e colaboradores (2018) desenvolveram lipossomas contendo nanopartículas de quitosana carregadas de DNA e utilizaram o modelo CAM para demonstrar o desempenho de lipossomas na entrega de genes. Os resultados mostraram que os lipossomas aumentaram pelo menos duas vezes em termos de eficiência da transfecção sem traumatizar os vasos sanguíneos circundantes, demonstrando um perfil de segurança aprimorado, que evidencia a biocompatibilidade dos sistemas e sua capacidade de fornecer genes para aplicações *in vivo* no campo da terapia gênica não viral.

Ferreira e colaboradores (2018) desenvolveram nanopartículas de sulfato de dextrano e quitosana e mostraram que a incorporação do bevacizumab nas nanopartículas promoveu um aumento na atividade antiangiogênica da droga no modelo CAM, mostrando uma redução constante do número de vasos sanguíneos ao longo do tempo. Esse comportamento indica que as nanopartículas são capazes de impedir não apenas a formação de novos vasos sanguíneos, mas também destruir os vasos existentes.

Assim, o uso do modelo CAM para o estudo da ação da curcumina incorporada ou não nos SLCs na angiogênese é fundamental para entender sua interação com o microambiente *in vivo*, fornecendo um sistema viável e seguro de administração de medicamentos para a potencial aplicação no tratamento do câncer.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial de SLCs acrescidos de curcumina para o tratamento do câncer cervical, avaliando a citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*.

2.1.1. Objetivos Específicos

- Desenvolver SCLs com quitosana e polietilenoimina para incorporação da curcumina e caracterizá-los por meio de microscopia de luz polarizada, reologia, espalhamento de raios X de baixo ângulo e mucoadesão *in vitro*;
- Avaliar os perfis de liberação e permeação *in vitro* da curcumina;
- Covalidar metodologia analítica para quantificação da curcumina nas formulações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Realizar estudos citotóxicos *in vitro* em cultura de células;
- Realizar estudos de angiogenicidade *in vivo* utilizando o modelo de membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Principais reagentes e matérias-primas:

- Acetato de sódio trihidratado (Sigma Aldrich®);
- Acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker®, USA);
- Ácido acético (Synth®, Brasil);
- Ácido oléico (Synth, Brasil);
- Água Ultrapurificada (Milli-Q®);
- Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (Croda, Brasil);
- Curcumina (Inlab®, Brasil);
- Etanol (Sigma Aldrich®, Brasil);
- Metanol (Sigma Aldrich®, Alemanha);
- Polietilenoimina (25 kDa) (Sigma Aldrich®, Alemanha);
- Propilenoglicol (Synth, Brasil);
- Quitosana de baixo peso molecular (Lubrizol, USA.);
- Span 60 (Audaz, Brasil).

Principais equipamentos:

- Agitador magnético com aquecimento (Fisatom, modelo 752^a);

- Analisador de textura (TA-Xtplus® - Stable Micro Systems®, UK);
- Balança analítica (METTLER, modelo H10);
- Balança semi-analítica (Shimadzu, modelo AW220);
- Banho ultrassônico (Elma E120H – Elmasonic);
- Células de difusão de Franz (Microette Plus – Hanson Research Corporation®);
- Coluna Zorbax C18 250 mm x 4.6mm, 5µm (Agilent, EUA);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE, Agilent);
- Estufa modelo 702.780 (Quimis®, Brasil);
- Micrometro Mitutoyo;
- Microscópio de luz polarizada (Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena);
- Reômetro de tensão controlada (Haake Rheostress®, modelo RS – 1);
- Sistema de purificação de água MILLIPORE®, Milli – Q Plus, condutividade 18,2µS.cm-1;
- Turrax (Ultra Turrax Quimis®);
- Vortex Mixer (KASVI basic).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação das formulações

O desenvolvimento do sistema líquido cristalino foi obtido pela mistura com agitação manual de fase oleosa composta por 20% de ácido oleico e 40% Procetyl® AWS e pela fase aquosa (40%) composta ou não pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5% (FPC), a partir do diagrama de fases desenvolvido por Victorelli et al. (2018).

Para verificar a influência dos polímeros, do muco da região vaginal e do fármaco nas características das formulações foram desenvolvidas também formulações sem os polímeros (FW), com adição de muco (constituído por cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), albumina, ácido lático, ácido acético, glicerol, uréia, glicose, mucina, água e ácido clorídrico (HCl) qsp pH 4,2) nas proporções de 30%, 50% e 100%, e de fármaco na concentração de 5mg/g (0,5%), de acordo com a Tabela 1. O fármaco foi adicionado na fase oleosa e em seguida a preparação foi colocada no banho ultrassônico por 10 minutos até total solubilização e depois foi adicionada a fase aquosa. Já o muco foi adicionado após a preparação do cristal líquido ser obtida.

Tabela 1. Sistemas desenvolvidos

Sistema	Água	QS + PEI 2,5%	Fármaco	Muco
FW	40%	-	-	-
FW30	40%	-	-	30%
FW50	40%	-	-	50%
FW100	40%	-	-	100%
FWC	40%	-	0,5%	-
FW30C	40%	-	0,5%	30%
FW50C	40%	-	0,5%	50%
FW100C	40%	-	0,5%	100%
FPC	30%	10%	-	-
FPC30	30%	10%	-	30%
FPC50	30%	10%	-	50%
FPC100	30%	10%	-	100%
FPCC	30%	10%	0,5%	-
FPC30C	30%	10%	0,5%	30%
FPC50C	30%	10%	0,5%	50%
FPC100C	30%	10%	0,5%	100%

Percentual m/m

3.2.2. Análise estrutural das formulações

3.2.2.1. Microscopia de luz polarizada

Uma pequena quantidade das formulações FW, FW30, FW50, FW100, FPC, FPC30, FPC50 e FPC100 foi colocada em lâminas e analisadas em microscópio de luz polarizada Jenamed, Carl Zeiss. Foi verificada a homogeneidade das formulações e utilizando a polarização foi possível observar a presença de área de anisotropia.

3.2.2.2 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As análises de SAXS foram executadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-Brasil), na linha SAXS1. Nesta linha possui um monocromador ($\lambda = 1.488 \text{ \AA}$) e um detector vertical instalado aproximadamente 1,5 m da amostra e um analisador multicanal que é utilizado para realizar o registro da intensidade do espalhamento $I(q)$, em função do vetor de espalhamento, q . A coleta de cada curva foi feita durante 45 segundos. Esse protocolo possibilitou a utilização de um vetor de espalhamento, q , entre cerca de 0,1 a 5 nm^{-1} (FONSECA

et al., 2016). O parâmetro de rede (d) foi calculado de acordo com a equação 1, onde q_1 é a posição do primeiro pico (FONSECA et al., 2016)

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

onde q_1 é a posição do primeiro pico (FONSECA et al., 2016).

3.2.2.3. Determinação do comportamento reológico

3.2.2.3.1. Análise reológica de cisalhamento contínuo (fluxo)

Essa análise foi realizada utilizando um reômetro modelo AR2000 – TA Instruments[®] com geometria *steel plate* com 40 mm de diâmetro e com gap de 200 μm . A análise foi realizada em triplicata.

Foi aplicada com uma espátula uma amostra com aproximadamente três gramas das formulações na placa inferior do reômetro, e foi esperado o tempo de repouso de 30 segundos para iniciar a análise. A taxa de cisalhamento empregada foi de 0 a 100 s^{-1} para a curva ascendente e de 100 a 0 s^{-1} para a curva descendente, com duração de 120 segundos cada. A análise foi realizada à 25,0°C e 37,0°C.

A análise quantitativa do comportamento de fluxo foi realizada avaliando os índices de consistência e fluxo de acordo com a equação 2:

$$\tau = k \cdot \gamma^\eta \quad (\text{equação 2})$$

em que “ τ ” representa a tensão de cisalhamento, “ γ ” a taxa de cisalhamento, “ k ” é o índice de consistência e “ η ” é o comportamento de fluxo (CALIXTO et al., 2015; VICTORELLI et al., 2018).

3.2.2.3.2. Análise reológica oscilatória

A análise oscilatória também foi executada utilizando um reômetro modelo AR2000 – TA Instruments[®] com geometria *steel plate* com 40 mm de diâmetro e com gap de 200 μm . A análise foi realizada em triplicata.

Inicialmente, foi executado o teste de varredura de tensão com o intuito de se determinar a região viscoelástica linear. A faixa de tensão de cisalhamento empregada nessa análise foi de 0 a 50 Pa e frequência de 1 Hz, à 25,0°C e 37,0°C. Em seguida da definição da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, foi realizado o teste de varredura de frequência para se determinar o módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para essa análise foi empregada a faixa de

frequência de 0 a 10 Hz, à tensão de 1 Pa à 25,0°C e 37,0°C (CALIXTO et al., 2015; VICTORELLI et al., 2018).

Com o objetivo de se determinar uma análise quantitativa da relação de G' com a frequência foi calculado o expoente η de acordo com a equação 3, que esclarece a estrutura dos sistemas desenvolvidos.

$$G' = S \cdot \omega^\eta \text{ (equação 3)}$$

em que G' representa o módulo de armazenamento, ω a frequência oscilatória, S a resistência do gel, e η o expoente viscoelástico (SAXENA et al. 2011).

3.2.2.4. Análise de perfil de textura

A análise do perfil de textura das formulações foi realizada empregando-se um analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Inglaterra), com o intuito de determinar as propriedades mecânicas, como adesividade, compressibilidade, coesão e dureza. Para a execução do teste, aproximadamente 10 g de formulações foram colocadas em tubos de centrífuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD®, Franklin Lakes, EUA). Após, com a intenção de retirar as bolhas de ar formadas e manter a sua superfície lisa e plana, os tubos foram centrifugados a 4000 rotações por minuto, ao longo de 3 minutos. Após, os tubos foram posicionados embaixo da sonda analítica (10 mm de diâmetro) do analisador de textura e foi programada para comprimir a formulação com uma velocidade de 0,5 mm/s até a profundidade pré-determinada (10 milímetros) e regressar para a superfície da amostra na mesma velocidade. Após um repouso de 5 segundos, uma segunda compressão foi iniciada, nas mesmas condições. As análises foram realizadas em triplicatas, à temperatura ambiente, conforme a metodologia modificada de Calixto et al. (2015).

3.2.2.5. Estudo *in vitro* de mucoadesão

Foi utilizado o analisador de textura TA.XT Plus – Stable Micro Systems®, a fim de avaliar, *in vitro*, a força que é preciso ser realizada para separar os sistemas da mucosa vaginal da porca, que foi obtida de um abatedouro local e preparada conforme descrito por Ramos et al. (2016).

As mucosas foram adicionadas em solução salina fisiológica contendo 0,9% (m/v) de NaCl (Merck), a $25 \pm 0,5$ °C durante 30 minutos e, então, a mucosa foi presa à extremidade inferior da sonda cilíndrica (diâmetro 10 mm) do texturômetro com um anel de borracha.

A análise inicia-se abaixando a sonda com uma velocidade constante de 1 mm/s até a mucosa entrar em contato com a amostra na temperatura de 37,0°C. Então, a formulação

permaneceu em contato com a mucosa durante 60 segundos e sem nenhuma aplicação de força. Após, a sonda subiu à velocidade constante (0,5 mm/s) até acontecer o destacamento entre a formulação e a mucosa. A força que é preciso para destacar a formulação da mucosa foi calculada pela área da curva de força *versus* tempo (BRUSCHI et al., 2008).

3.2.3. Validação da metodologia analítica para quantificação de curcumina por cromatografia líquida de alta eficiência

A validação da metodologia analítica foi adaptada da metodologia de Santos – Fonseca et al. (2017) e realizada usando os seguintes parâmetros: linearidade, precisão intra-corrída e intermediária, exatidão, seletividade, limite de detecção e limite de quantificação, de acordo com as especificações da RDC N°166 da ANVISA (BRASIL, 2017) e diretrizes do guia *Harmonised Tripartite Guideline* (ICH, 2005).

O equipamento utilizado foi um HPLC AGILENT, modelo 1200, com detector UV-Vis. A Tabela 2 mostra os parâmetros empregados.

Tabela 2. Parâmetros empregados na validação da metodologia analítica.

Fase móvel	Acetonitrila e ácido acético 2% (50:50)
Coluna	C18-Eclipse, Agilent Zorbax®, dimensões 4,6mm x250mm, 5 µm de tamanho de partícula
Deteção	425 nm
Vazão	1,2 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	33°C ± 2°C
Tempo de retenção	8,9 minutos

3.2.3.1. Seletividade

Esta análise foi realizada a fim de garantir que os compostos dos sistemas não interferiram nas análises quantitativas da CUR. A seletividade do método analítico empregado foi

investigada comparando os resultados obtidos por meio das análises do fármaco livre, componentes das formulações sem o fármaco e da fase móvel.

3.2.3.2. Linearidade

A linearidade do método foi definida pela média da construção de três curvas analíticas da CUR. Utilizou-se uma solução estoque de CUR (100 µg/mL) para desenvolver as soluções padrões de concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0, 50,0 e 70 µg/mL e as leituras das amostras foram realizadas em triplicata (n=3). A análise de variância ANOVA a nível de $\alpha = 0,05$ (95% do intervalo de confiança) foi utilizada para avaliar os resultados obtidos.

3.2.3.3. Precisão

A precisão foi determinada através de ensaios de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada analisando-se três concentrações de CUR (baixa, média e alta) em triplicata em um mesmo dia, com o mesmo analista e mesma instrumentação e condições experimentais. Já a precisão intermediária, foi avaliada pela análise das mesmas três concentrações de CUR, realizadas em 2 dias distintos com dois analistas diferentes.

Para verificar a semelhança entre os resultados obtidos, calculou-se o desvio padrão relativo (DPR), de acordo com a equação 4, onde DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100 \text{ (equação 4)}$$

3.2.3.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da contaminação das formulações em branco utilizando três concentrações conhecidas da CUR: baixa (2,5 µg/mL), média (50 µg/mL) e alta (70 µg/mL), por meio de uma solução estoque de CUR (100 µg/mL) e de uma solução estoque de formulação sem o fármaco na concentração de 7mg/mL e 2mg/mL. As amostras foram analisadas em triplicata em um mesmo dia. O cálculo de recuperação exibido na equação 5 foi utilizado para verificar o grau de concordância entre os resultados obtidos em relação aos valores teóricos.

$$\text{Recuperação} = \text{Concentração média experimental} \times 100 / \text{Concentração teórica (equação 5)}$$

3.2.3.5. Limite de detecção (LD)

Foi possível determinar a menor quantidade de CUR que pode ser detectada por meio do desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas desenvolvidas, de acordo

com a equação 6, onde IC é a inclinação da curva analítica e σ é o desvio padrão (BRASIL, 2017).

$$LD = (3,3 \times \sigma) / IC \text{ (equação 6)}$$

3.2.3.6. Limite de quantificação (LQ)

A menor quantidade de CUR que pode ser quantificada com precisão e exatidão foi verificada através do desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas analíticas desenvolvidas, de acordo com a equação 7, em que IC é a inclinação da curva analítica e σ é o desvio padrão (BRASIL, 2017).

$$LQ = (10 \times \sigma) / IC \text{ (equação 7)}$$

3.2.3.7. Doseamento do fármaco no sistema líquido cristalino

O ensaio de doseamento visou quantificar o teor do fármaco na formulação. Para determinar a quantidade de CUR presente nos SLCs, 1g de SLC contendo 5mg/g de CUR foi pesada e dissolvida em metanol (100 mL). As amostras foram agitadas e homogeneizadas e após, uma alíquota de 5 mL da amostra foi adicionada em um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol. As amostras foram analisadas por CLAE após serem filtradas em membranas PVDF (0,45 μ m).

3.2.4. Ensaio de liberação, permeação e retenção *in vitro*

3.2.4.1. Avaliação da cinética de liberação *in vitro* da curcumina

Os estudos de liberação *in vitro* da curcumina em suspensão e incorporada nos sistemas foram realizados empregando equipamento Microette (Hanson) composto por células de difusão de Franz. Nesse experimento utilizou-se membrana sintética de polietersulfona (0,45 μ m) e solução receptora composta por propilenoglicol 15%, Span® 60 1%, etanol 5% e tampão acetato pH 4.4 qsp à 37,0°C $\pm$ 0,5°C realizado com adaptações de acordo com Rodero et al., 2018 e sob agitação de 300 rpm. Primeiramente, as formulações foram pesadas (300 mg) e adicionadas ao anel dosador localizado no compartimento doador da célula de difusão de Franz. As amostras foram coletadas do compartimento receptor em tempos pré-determinados (5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h). A CUR liberada das amostras foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com comprimento de onda de 425 nm conforme o método analítico validado por Fonseca-Santos et al. (2017).

3.2.4.2. Ensaio de permeação e retenção *in vitro* da curcumina

O ensaio de permeação *in vitro* da CUR em solução e incorporada nas formulações foi também realizado no equipamento Microette (Hanson) composto por células de difusão de Franz e com solução receptora composta por propilenoglicol 15%, Span® 60 1%, etanol 5% e tampão acetato pH 4.4 qsp à $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ realizado com adaptações de acordo com Rodero et al., 2018 e sob agitação de 300 rpm. Para realização desse ensaio, primeiramente, foram adquiridas mucosas vaginais de porcas e preparadas de acordo com Ramos et al., (2016). Antes de cada experimento, a espessura da mucosa foi medida empregando o micrômetro Mitutoyo. Qualquer mucosa fora das especificações não foi utilizada nos experimentos. Após, as mucosas foram colocadas na parte superior da célula de Franz. Primeiramente, as amostras (CUR em suspensão e incorporada nas formulações) foram pesadas (300 mg) e adicionadas ao anel dosador localizado no compartimento doador da célula de difusão de Franz. As amostras foram coletadas do compartimento receptor em tempos pré-determinados (5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h). A CUR permeada foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com comprimento de onda de 425 nm conforme o método covalidado.

A extração do fármaco retido na mucosa vaginal de porco foi realizada a partir do método adaptado de Victorelli (2018). Após as 12 horas de experimento, as mucosas foram retiradas do compartimento doador das células de Franz. A área da mucosa exposta à formulação foi levemente limpada com papel higiênico, recortada e picotada com tesoura. Os fragmentos obtidos foram adicionados em tubos de centrifuga de 15 mL (Falcon, BD®, Franklin Lakes, EUA), nos quais foram adicionados 4mL de metanol e homogeneizados em Turrax® a 10000 rpm a longo de 2 minutos, até a total dilaceração da mucosa. Em seguida, os tubos foram posicionados no banho ultrassônico por 30 minutos. Após, a CUR presente no sobrenadante foi quantificada por CLAE (Agilent) com comprimento de onda de 425 nm conforme o método analítico validado. A Figura 7 ilustra brevemente o ensaio.

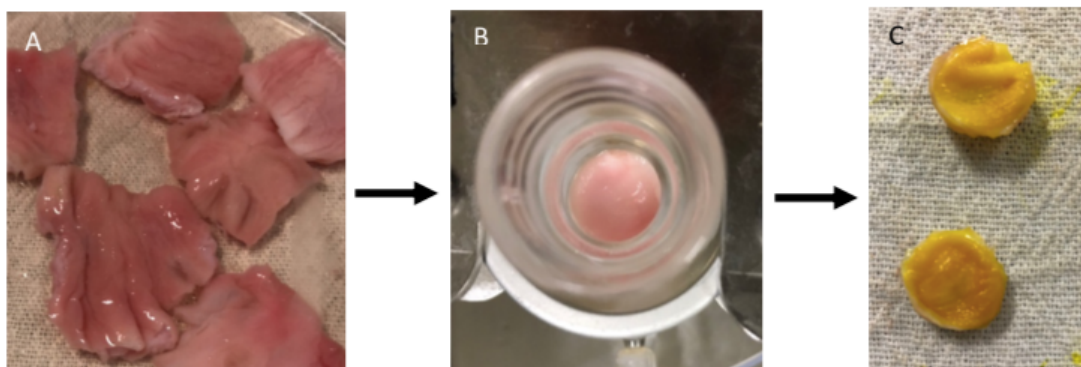


Figura 7. Figura (A) ilustra a mucosa vaginal de porca. Figura (B) ilustra a mucosa sobre a célula de difusão de Franz. Figura (C) ilustra a mucosa no final do experimento.

3.2.5. Ensaio de citotoxicidade

3.2.5.1. Teste de citotoxicidade por difusão em meio ágar *in vitro* em linhagem celular fibroblastos (L929) e de câncer cervical (Hela)

As linhagens celulares utilizadas foram L929 e Hela, que correspondem a uma linhagem de fibroblasto normal e câncer cervical, respectivamente. Ambas foram cultivadas à $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, contendo meio de cultura Dulbecco DMEM com soro fetal bovino a 10% (FBS) em uma atmosfera com 5% de CO_2 . Uma suspensão celular com concentração de 1×10^6 células / mL foi preparada em um frasco de cultura Corning de 75 cm^2 e incubada até atingir 75-80% de confluência celular.

Quando a confluência desejada foi atingida, foi realizada uma suspensão celular na concentração de 1×10^6 células / mL. Posteriormente foram pipetados 4 ml desta suspensão em cada poço (3,5 cm de diâmetro) em placas de 6 poços (Costar®). Essa suspensão foi constituída pela concentração celular já citada acima e meio Dulbecco's com 5% de soro fetal bovino. Estas placas foram incubadas à $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com 5% de CO_2 , por 48 h, para permitir a adesão a fim de formar uma monocamada celular. A viabilidade celular mínima para a realização do ensaio foi de 85%.

Após 48 horas, o meio de cultura foi removido e realizou-se a lavagem dos poços com 2 ml de tampão fosfato pH 7,4 (PBS). Em seguida, o PBS foi removido e 1 mL de meio ágar a 1,8% foi adicionado, com corante vermelho neutro a 0,01% e DMEM 2x concentrado (1: 1, v / v). Tanto o ágar quanto o meio de cultura permaneceram em banho-maria a 40°C até serem colocados em contato com a monocamada de células. Após a adição do ágar nos poços a placa foi deixada em repouso por 15 minutos para solidificar na capela de fluxo laminar à temperatura ambiente.

Para aplicar as formulações, os discos de papel estéreis foram embebidos nas formulações líquido-cristalinas, e foram colocados com pinças cirúrgicas no centro do poço contendo ágar. Para o controle celular, o primeiro poço recebeu apenas o meio de cobertura. Para o controle negativo, foi utilizado disco de papel filtro embebido em meio de cultura DMEM, e para o controle positivo, foi utilizado disco de papel filtro embebido em TRITON-X, como mostra a Figura 8.

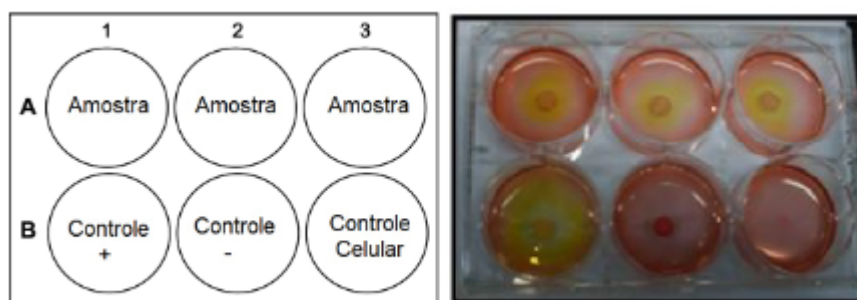


Figura 8. Placa de seis poços utilizada no método de difusão em ágar. Fonte: Rodero, et al., 2017.

Todos os sistemas líquido-cristalinos foram testados em triplicata. As placas foram embrulhadas em papel de alumínio, para evitar a fotoativação do vermelho neutro e então as placas foram levadas à estufa à 37,0°C com 5% de CO₂ por 24 h (FACHINETTI et al., 2018).

Após a incubação por 24h, os poços foram macroscopicamente observados e um halo claro se formou ao redor das amostras e dos controles positivos, relativos à citotoxicidade dos sistemas líquido-cristalinos.

Para interpretação dos resultados, as médias finais obtidas para cada amostra foram relacionadas ao grau de citotoxicidade como consta na Tabela 3.

Tabela 3. Graus de citotoxicidade para classificação das amostras.

Grau	Citotoxicidade	Zona de citotoxicidade
0	Ausência	Ausência de descoramento sob a amostra
1	Leve	Zona de descoramento limitada à área sob a amostra
2	Branda	Zona de descoramento a partir da amostra até 0,5 cm
		Zona de descoramento a partir da amostra entre 0,5 a
3	Moderada	1,0 cm
4	Severa	Zona de descoramento maior que 1,0 cm

3.2.6. Ensaio *in vivo* utilizando o modelo de membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM)

O experimento foi realizado após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo (CEUA/IFSC) sob protocolo de número 9261230819.

3.2.6.1. Obtenção do modelo de CAM

Os ovos de galinha foram doados por um produtor local (AD'ORO S.A., São Carlos/SP, Brasil). No primeiro dia do desenvolvimento embrionário (ED1), os ovos foram limpos com álcool 70% e armazenados em uma incubadora úmida em 37,7°C, em constante movimento de rotação lenta por um período de 30 minutos. No ED4, a rotação foi interrompida e foi aberta uma janela com aproximadamente 2 cm² na parte mais fina da casca, com ajuda de uma tesoura e uma pinça. Logo em seguida, cerca de 3 mL de albumina foram retiradas com seringa e agulha e, então, a janela foi selada com fita adesiva. Os ovos foram mantidos na incubadora até o sétimo dia, quando os vasos sanguíneos atingiram uma fase de proliferação e tamanho adequados para análise. Todos os procedimentos foram realizados dentro de um fluxo laminar para evitar contaminação.

3.2.6.2. Ensaio para avaliação das alterações vasculares da CAM

Para a realização do ensaio, no ED7, foram aplicados 50 µL das formulações e, com um microscópio USB de aumento de até 400 X (USB Microscope, China), imagens foram obtidas antes da aplicação, imediatamente após, depois de 4 horas e 24 horas (no ED8) para a análise das alterações vasculares ao longo do tempo. Os ovos foram sacrificados com congelamento a -20°C.

3.2.6.3. Grupos experimentais

Com o intuito de verificar o efeito das formulações no processo de angiogênese, as formulações com e sem polímeros e com e sem curcumina, sem diluição e com diluição de 10%, foram aplicadas sobre a CAM no ED7, de acordo com a Tabela 4. No grupo controle foi adicionado soro fisiológico.

Tabela 4. Grupos experimentais para a realização do ensaio utilizando o modelo CAM.

Formulação	Diluição	Volume adicionado
Controle	-	100 µL
FW	-	100 µL
FPC	-	100 µL
FWC	-	100 µL
FPCC	-	100 µL
FW	-	50 µL
FPC	-	50 µL
FWC	-	50 µL
FPCC	-	50 µL
FW	-	20 µL
FPC	-	20 µL
FWC	-	20 µL
FPCC	-	20 µL
FW	10%	50 µL
FPC	10%	50 µL
FWC	10%	50 µL
FPCC	10%	50 µL

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparação das formulações

Anteriormente Victorelli et al. (2018) desenvolveram um diagrama de fases para avaliar a mistura de diferentes proporções da fase aquosa, fase oleosa e tensoativo em questão necessária para desenvolver as formulações. Após a preparação das várias combinações, as formulações resultantes foram classificadas como microemulsão (ME), emulsão (EM), sistema líquido-cristalinos (SLC) ou separação de fases (SF). Essa classificação resultou na construção do diagrama mostrado na Figura 9.

Ao observar o diagrama formado, a uma concentração inferior a 40% do tensoativo, entre 5% e 40% da fase aquosa e acima de 35% da fase oleosa, está presente uma região SF. Abaixo de 30% de tensoativo e cobrindo quase todo o eixo da fase aquosa e oleosa, é possível observar a formação de EM. A formação de microemulsões é observada em duas regiões do diagrama; a primeira região está abaixo de 60% de tensoativo, 45% de fase aquosa e 20% de fase oleosa, enquanto a segunda região cobre todo o eixo do tensoativo e fase oleosa e entre 0% e 35% da fase aquosa. A região líquida cristalina está presente entre 25% e 75% de tensoativo, entre 25% e 70% de fase aquosa, e entre 0% e 40% de fase oleosa. A formulação FPC foi escolhida pois

ela demonstrou ser um sistema líquido cristalino promissor para aplicações tópicas. Victorelli e colaboradores (2018) desenvolveram um sistema líquido cristalino contendo quitosana e polietilenoimina carregado com metronidazol para o tratamento de infecções tópicas. O sistema mostrou ser elástico, bioadesivo e modular a liberação do fármaco, permitindo que o fármaco fique por mais tempos sobre a pele (VICTORELLI et al., 2018).

Então, foi adicionado os pontos das formulações desenvolvidas com adição de muco vaginal artificial do atual projeto no diagrama de fases anteriormente desenvolvido e verificou-se a transformação da formulação FPC quando adicionado as concentrações de 30%, 50% e 100% de muco vaginal artificial, que contribuiu para um aumento da concentração da fase aquosa de acordo com a Figura 9.

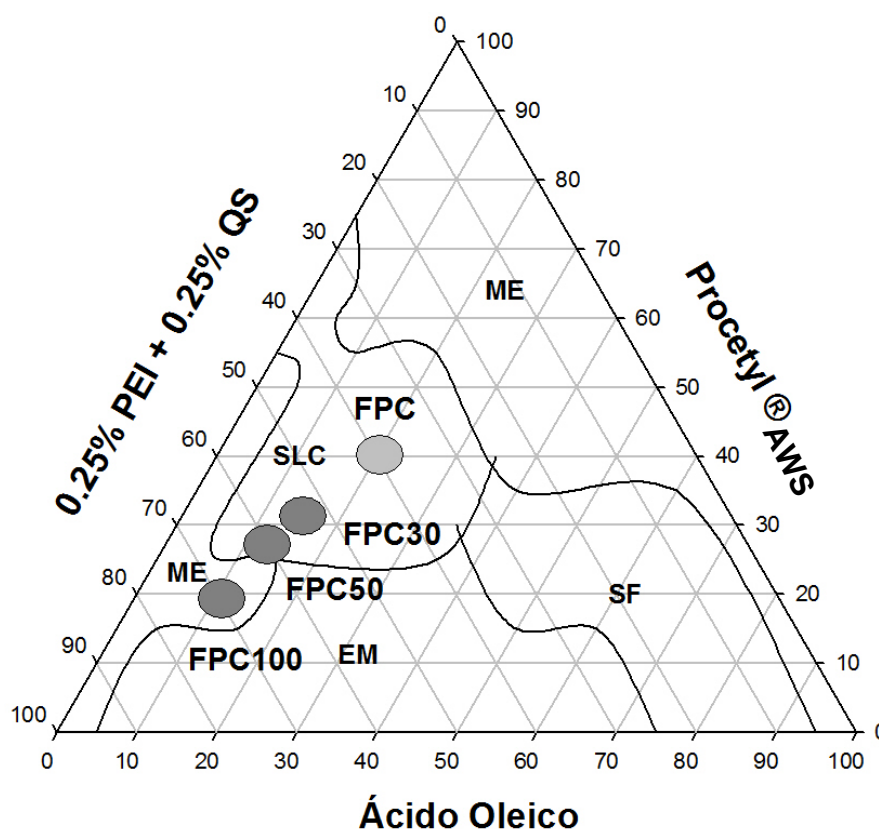


Figura 9. Diagrama de linha do sistema FPC, FPC30, FPC50 e FPC100. Abreviações: FPC é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenoimina 2,5%. FPC30 é a formulação FPC com adição de 30% de muco. FPC50 é a formulação FPC com adição de 50% de muco. FPC100 é a formulação FPC com adição de 100% de muco. ME significa microemulsão, EM significa emulsão, SF significa separação de fase e SLC significa sistema líquido cristalino. Fonte: VICTORELLI et al., 2018.

A Figura 10 apresenta o aspecto visual das formulações com e sem muco. É possível observar que todas as formulações são viscosas, porém as formulações com adição de 100% de muco apresentaram uma diminuição na viscosidade.

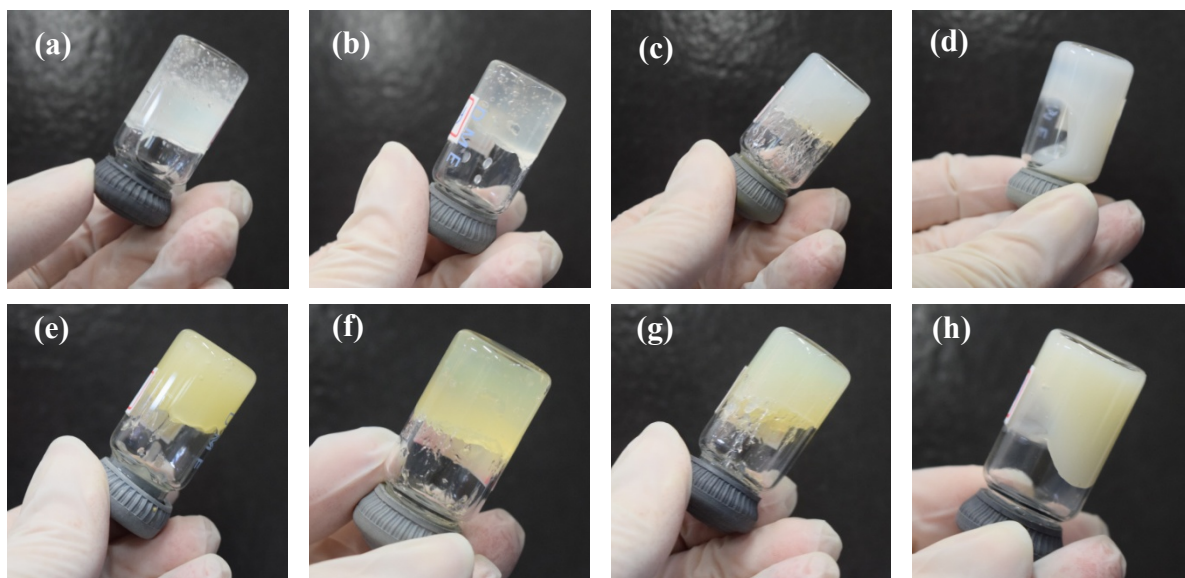


Figura 10. Fotografia das seguintes formulações: FW (a); FW30 (b); FW50 (c); FW100 (d); FPC (e); FPC30 (f), FPC50 (g) e FPC100 (h). Abreviações: FW é a formulação composta por 40% Procetyl[®] AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa. FW30 é a formulação FW com adição de 30% de muco. FW50 é a formulação FW com adição de 50% de muco. FW100 é a formulação FW com adição de 100% de muco. FPC é a formulação composta por 40% Procetyl[®] AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5%. FPC30 é a formulação FPC com adição de 30% de muco. FPC50 é a formulação FPC com adição de 50% de muco. FPC100 é a formulação FPC com adição de 100% de muco.

4.2. Análise estrutural das formulações

4.2.1. Microscopia de luz polarizada (MLP)

A MLP é uma técnica que possibilita realizar uma análise estrutural dos SLCs. Os SLCs foram identificados pela presença de estrias, característico da mesofase hexagonal, presença de cruz de malta, característico da mesofase lamelar e presença de campo escuro, característico da mesofase cúbica, uma vez que a formulação também se apresentou viscosa (SALMAZI et al., 2015). A análise foi realizada com todas as formulações sem fármaco da Tabela 1 e os resultados podem ser visto nas Figuras 11 e 12.

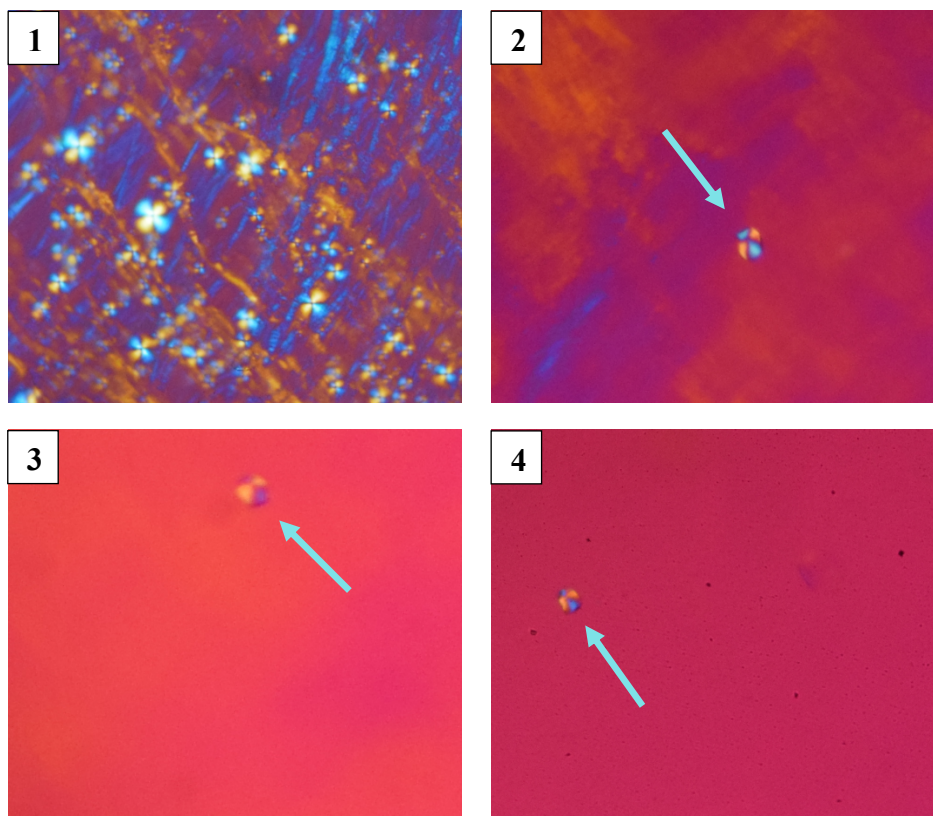


Figura 11. As formulações FW (1), FW30 (2), FW50 (3) apresentaram estrias e cruz de malta e FW100 (4) apresentou campo escuro e cruz de malta. Abreviações: FW é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa. FW30 é a formulação FW com adição de 30% de muco. FW50 é a formulação FW com adição de 50% de muco. FW100 é a formulação FW com adição de 100% de muco.

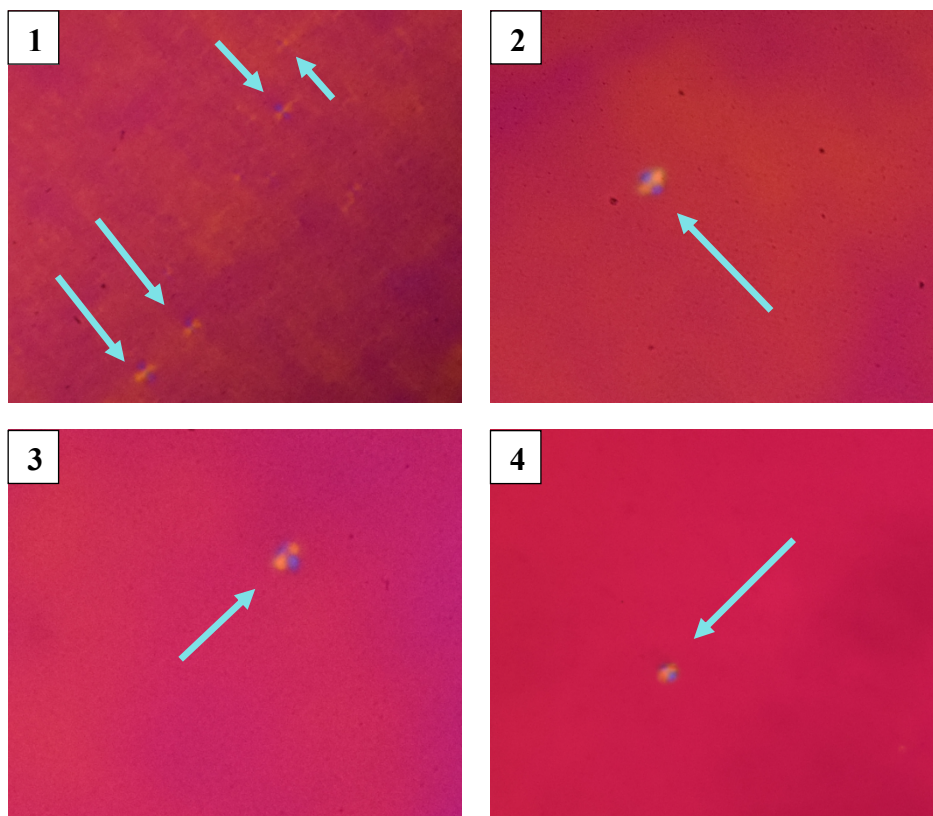


Figura 12. As formulações FPC (1), FPC30 (2), FPC50 (3) apresentaram estrias e cruz de malta e a formulação FPC100 (4) apresentou campo escuro e cruz de malta. Abreviações: FPC é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5%. FPC30 é a formulação FPC com adição de 30% de muco. FPC50 é a formulação FPC com adição de 50% de muco. FPC100 é a formulação FPC com adição de 100% de muco.

As imagens sugerem que as formulações são SLCs de fase lamelar, caracterizadas pela presença de cruz de malta

Apesar do sistema FPC100 aparecer na área de microemulsão no diagrama apresentado na Figura 9, foi possível verificar na análise de microscopia de luz polarizada que o sistema apresenta pequenas cruz de malta o que pode indicar que o sistema seja um cristal líquido de fase lamelar. Essa diferença pode ser causada pela presença dos constituintes do muco vaginal artificial, como por exemplo a mucina. Os polímeros apresentam uma alta afinidade com a mucina, podendo então alterar a estrutura interna da formulação (TAKEUCHI et al., 2005). Além disso, a formulação é transparente e apresenta uma viscosidade de líquido viscoso, característico de fase lamelar.

4.2.2 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Este procedimento é capaz de detectar o espalhamento dos raios X em ângulos de θ menor que 10° , que equivale a distâncias interplanares com dimensões nanométricas. Por isso, esta técnica é eficaz na caracterização de sistemas compostos por tensoativo pela possibilidade de

se determinar o tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas (CARVALHO et al., 2012; MANAIA et al., 2012).

Os SLCs podem ser orientados para formar estruturas mono, di ou tridimensionais e as curvas de SAXS mostram intensidades de pico de Bragg para valores específicos do vetor de espalhamento q (CHORILLI et al., 2011; MALMSTEN et al., 2002). É possível descobrir qual o tipo da estrutura cristalina através da relação entre as posições desses picos e do cálculo de parâmetros estruturais de rede (KLUG et al., 1954). A distância (d) entre os vetores de espalhamento foi calculada conforme a equação 6:

$$d = \frac{2\pi}{q_{max}} \quad (\text{equação 6})$$

As estruturas dos cristais líquidos liotrópicos, conhecidos como hexagonal, lamelar e cúbica, podem ser determinadas de acordo com a localização dos picos de difração no eixo do vetor de espalhamento q . A posição relativa dos picos (em relação ao primeiro pico mais intenso) das estruturas lamelares, geralmente segue à relação 1:2:3 já das estruturas hexagonais a relação esperada é 1: $\sqrt{3}$:2: $\sqrt{7}$ (HOLMQVIST et al., 1997). Enquanto para os cristais líquidos de fase cúbica correlacionam-se os valores 1,41:1,73:2,82:3 (YARIV et al., 2010).

O estudo de SAXS foi realizado a fim de confirmar a estrutura lamelar das amostras e a intensidade dos padrões de espalhamento (I) foram plotados versus o módulo de vetor de espalhamento q ($\text{\AA}^{-1}$). As curvas dos dados de SAXS estão mostradas na Figura 13 para a formulação FPC com e sem CUR.

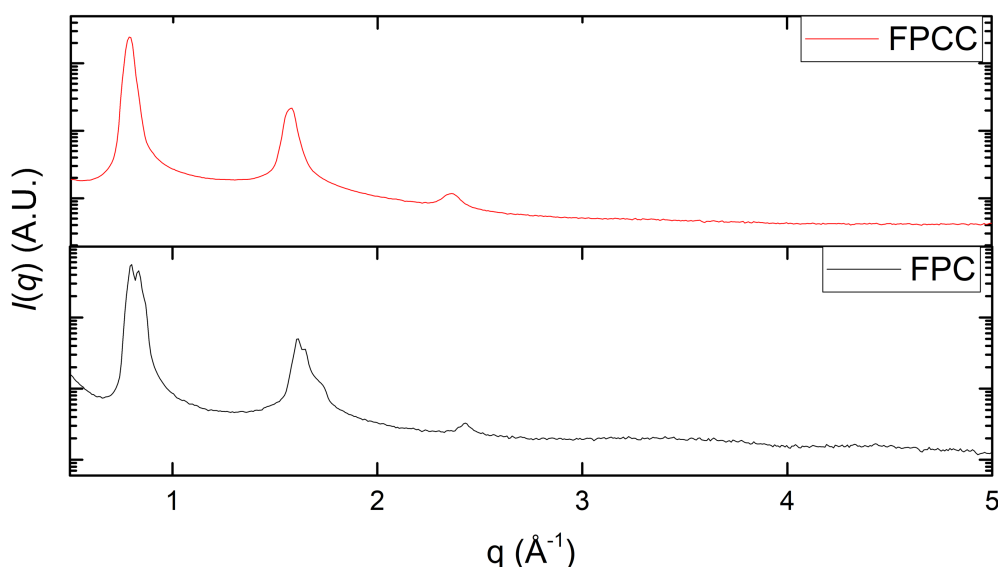


Figura 13. Avaliação estrutural das formulações FPC e FPCC por SAXS. Abreviações: FPC é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5%. FPCC é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5% e 0,5mg/g de curcumina.

As formulações FPC e FPCC apresentaram uma correlação entre as distâncias dos objetos espalhadores $d_1/d_2 = 2$ e $d_1/d_3 = 3$, indicando uma periodicidade semelhante a um arranjo líquido cristalino de fase lamelar, comprovada pela presença de “cruzes de malta” na MLP. Neste caso, d representa o espaçamento entre duas camadas adjacentes formadas pelo sistema líquido cristalino de fase lamelar (CHO et al., 2004; SONI et al., 2006; FONSECA – SANTOS et al., 2017)

Chorilli et al. (2011) desenvolveram um sistema líquido cristalino utilizando água, poliéter funcional siloxano como tensoativo e copolímero de silício glicol como tensoativo. Eles observaram cruzes de malta na MLP e no estudo de SAXS verificaram a presença de dois picos de Bragg com correlação entre as distâncias de 1: 2, o que é indicativo da presença de uma estrutura lamelar.

Calixto et al. (2018) também confirmaram as estruturas obtidas na MLP por SAXS. Os sistemas precursores de cristal líquido formados por álcool cetílico etoxilado 20 e propoxilado

5, ácido oleico e dispersão de QS e PEI em diferentes proporções apresentaram diferentes estruturas inclusive a lamelar na presença de saliva, cuja correlação de distância foi de 2:3.

4.2.3. Determinação do comportamento reológico

O comportamento reológico retrata as propriedades de fluxo e deformação da matéria, como sistemas líquidos, semi-sólidos e sólidos (AULTON et al., 2005; LAHOUD et al., 2009).

Dessa forma, o ensaio reológico é um experimento importante na análise de sistemas nanoestruturados, uma vez que estes também estão sujeitos a receber tensões durante a aplicação dos mesmos na mucosa vaginal.

4.2.3.1 Análise reológica de cisalhamento contínuo (fluxo)

Os reogramas de curva de fluxo correlacionando tensão (τ) e taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) foram obtidos (SCHRAMM, 2006). Essas curvas têm origem do comportamento da formulação com o aumento da taxa de cisalhamento (curva ascendente) e com a diminuição da taxa de cisalhamento (curva descendente) (ISAAC *et al.*, 2008).

A classificação do comportamento de fluxo dos sistemas em Newtoniano ou não Newtoniano, é realizada pela análise da curva ascendente. O fluxo não Newtoniano pode ser classificado como pseudoplástico, dilatante ou plástico. Já através da curva descendente é possível classificar as formulações quanto à tixotropia (dependentes ou não do tempo) ou reopexia (SCHRAMM, 2006).

As relações entre a taxa de cisalhamento e a taxa de tensão das formulações FW, FW30, FW50, FW100, FWC, FW30C, FW50C, FW100C, FPC, FPC30, FPC50, FPC100, FPCC, FPCC30, FPCC50, FPCC100 à 25,0°C e 37,0°C estão demonstradas nas Figuras 14 e 15:

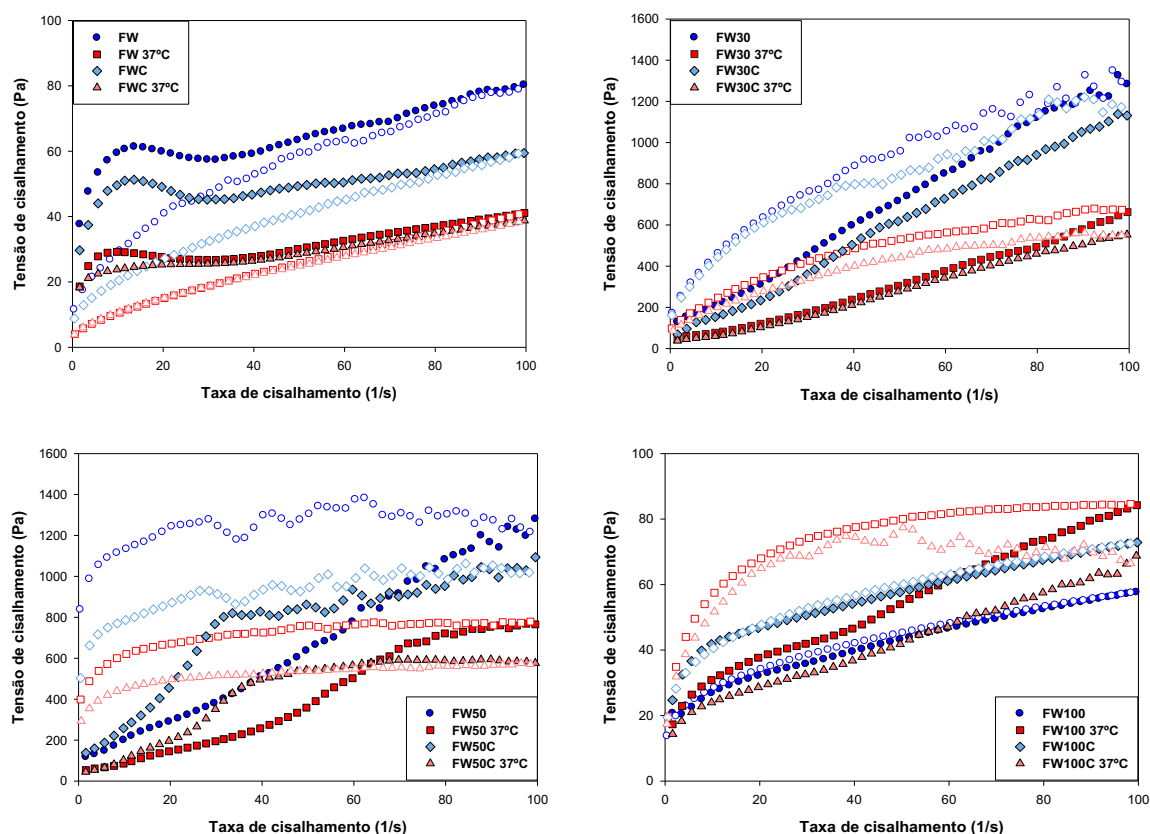


Figura 14. Reogramas de fluxo das formulações ilustram a relação entre tensão de cisalhamento (Pa) e taxa de cisalhamento (1/s) de FW, FWC, FW30, FW30C, FW50, FW50C, FW100, FW100C à 25,0°C e 37,0°C. Símbolos fechados representam a curva de ida e símbolos abertos representam a curva de volta. Abreviações: FW é a formulação composta por 40% Procetyl[®] AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa. FW30 é a formulação FW com adição de 30% de muco. FW50 é a formulação FW com adição de 50% de muco. FW100 é a formulação FW com adição de 100% de muco. FWC é a formulação FW com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW30C é a formulação FW30 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW50C é a formulação FW50 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW100C é a formulação FW100 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. Os coeficientes de variação das análises em triplicata foram inferiores a 10% em todos os casos.

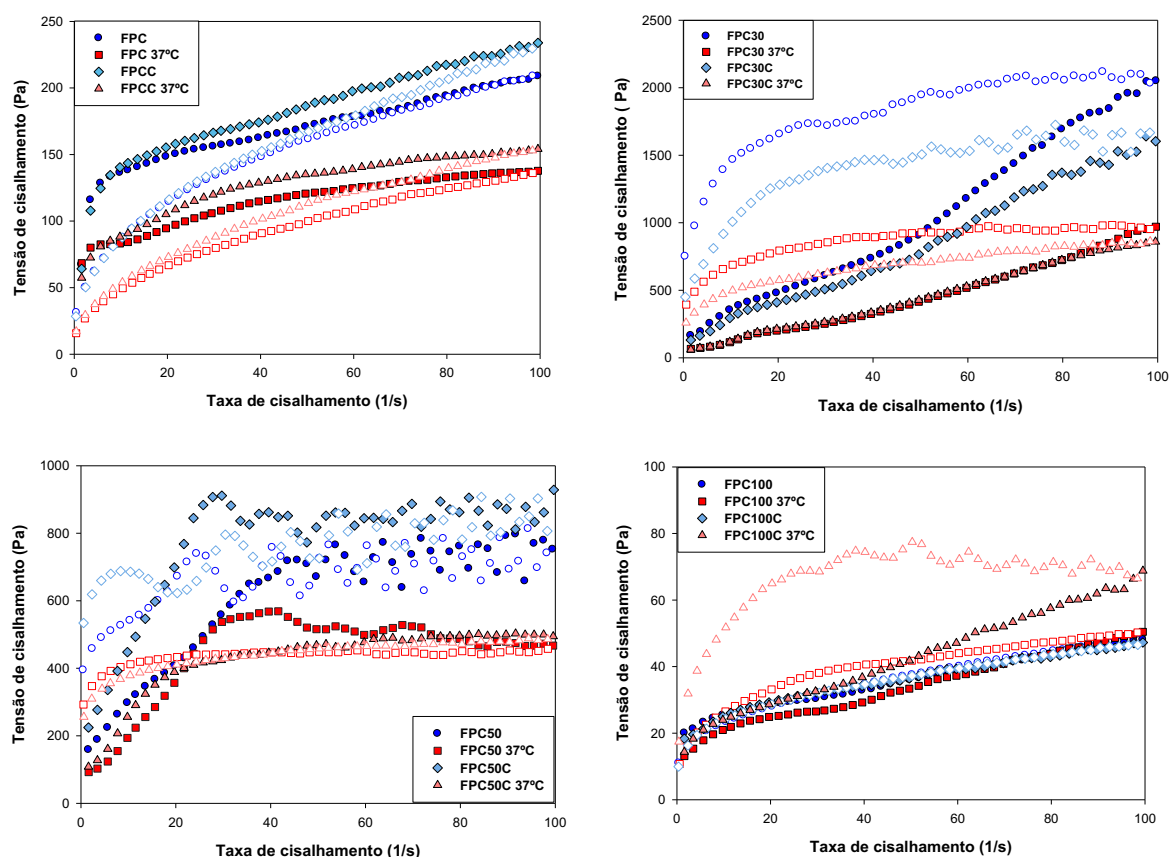


Figura 15. Reogramas de fluxo das formulações ilustram a relação entre tensão de cisalhamento (Pa) e taxa de cisalhamento (1/s) de FPC, FPCC, FPC30, FPC30C, FPC50, FPC50C, FPC100, FPC100C à 25,0°C e 37,0°C. Símbolos fechados representam a curva de ida e símbolos abertos representam a curva de volta. Abreviações: FPC é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5%. FPC30 é a formulação FPC com adição de 30% de muco. FPC50 é a formulação FPC com adição de 50% de muco. FPC100 é a formulação FPC com adição de 100% de muco. FPCC é a formulação FPC com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC30C é a formulação FPC30 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC50C é a formulação FPC50 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC100C é a formulação FPC100 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. Os coeficientes de variação das análises em triplicata foram inferiores a 10% em todos os casos.

Os dados de valores do índice de consistência (K) e comportamento de fluxo (n), estão demonstrados na Tabela 5 de acordo com a temperatura da análise.

Tabela 5. Índice de fluxo (n) e índice de consistência (k) das formulações FW, FW30, FW50, FW100, FWC, FW30C, FW50C, FW100C, FPC, FPC30, FPC50, FPC100, FPCC, FPC30C, FPC50C e FPC100C à 25,0°C e 37,0°C.

Temperatura		25,0°C		37,0°C	
Formulações	n	k	n	k	
FW	0,15 ± 0,01	37,68 ± 1,73	0,17 ± 0,02	16,93 ± 1,15	
FW30	0,86 ± 0,01	25,15 ± 1,38	1,05 ± 0,02	5,02 ± 0,34	
FW50	0,96 ± 0,02	15,77 ± 1,39	1,11 ± 0,04	5,09 ± 0,86	
FW100	0,34 ± 0,01	11,93 ± 0,39	0,49 ± 0,02	8,46 ± 0,56	
FWC	0,10 ± 0,01	34,45 ± 1,53	0,21 ± 0,01	13,59 ± 0,74	
FW30C	0,92 ± 0,01	16,91 ± 0,76	1,03 ± 0,01	4,93 ± 0,28	
FW50C	0,47 ± 0,03	129,98 ± 13,61	0,56 ± 0,04	51,81 ± 8,85	
FW100C	0,25 ± 0,01	21,96 ± 0,47	0,50 ± 0,02	6,38 ± 0,46	
FPC	0,20 ± 0,01	81,97 ± 2,33	0,20 ± 0,01	53,82 ± 1,10	
FPC30	1,01 ± 0,03	19,93 ± 2,36	1,10 ± 0,02	6,02 ± 0,62	
FPC50	0,36 ± 0,02	156,12 ± 15,14	0,26 ± 0,04	168,88 ± 26,70	
FPC100	0,28 ± 0,01	12,63 ± 0,57	0,42 ± 0,02	6,92 ± 0,45	
FPCC	0,24 ± 0,01	74,68 ± 2,05	0,23 ± 0,00	53,28 ± 0,71	
FPC30C	0,93 ± 0,02	22,74 ± 2,30	0,96 ± 0,02	10,63 ± 0,75	
FPC50C	0,22 ± 0,02	336,35 ± 32,05	0,27 ± 0,02	157,95 ± 10,70	
FPC100C	0,27 ± 0,01	13,08 ± 0,32	0,50 ± 0,02	6,38 ± 0,46	

Segundo a equação $\tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$, $n > 1$ corresponde a um fluido dilatante, $n < 1$ corresponde a um fluido pseudoplástico e $n = 1$ corresponde um fluido newtoniano. Ademais, é possível medir o grau de “pseudoplasticidade” por meio do comportamento de fluxo (n), que aumenta com a diminuição da pseudoplasticidade (FORMARIZ et al., 2008).

Nas Figuras 14 e 15 foi possível observar que a maioria das amostras apresenta comportamento não Newtoniano à temperatura de 37,0°C±0,5°C, isto é, não apresentaram linearidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento, indicando que a taxa de cisalhamento causou alterações na viscosidade visível dos cristais líquidos (SCHRAMM, 2006). A maioria das formulações à 25,0±0,5°C apresentaram as mesmas características.

As formulações FW30, FW50, FW30C, FPC30 e FPC30C à temperatura de 37,0°C±0,5°C e as formulações FW50, FW30C, FPC30 e FPC30C à 25,0±0,5°C apresentaram comportamento Newtoniano ($n=1$) (SCHRAMM, 2006), isso indica que a taxa de cisalhamento não afetou a viscosidade das formulações e, conseqüentemente, a viscosidade desse tipo de fluido é constante (SCHRAMM, 2006).

Nas demais formulações foi observado que em ambas as temperaturas estudadas existe uma pequena tensão de cisalhamento, conhecida como *yield stress* (tensão de cedência ou limite de

escoamento), que indica a tensão necessária para as formulações começarem a fluir e seguidamente começam a se comportarem como fluidos pseudoplástico ($n < 1$) (MAZZARINO et al., 2007). O fluxo pseudoplástico é característico de materiais que quando a taxa de cisalhamento passa de níveis baixos para níveis mais altos os materiais sofrem diminuição na viscosidade. Partículas rígidas são orientadas na direção do fluxo com o aumento da taxa de cisalhamento, gerando *shear thinning*, que é o afinamento por cisalhamento (SAVIC et al., 2011). Se o valor mínimo de tensão de cedência não for atingido, a formulação resiste à tensão de cisalhamento aplicada e se comporta como sólido (MACHADO, 2002).

Na Tabela 5 é possível observar que a formulação FPC sem muco e com 30% e 50% de muco apresentam no geral um índice de consistência (k) maior que FW sem muco e com 30% e 50% de muco. Este fato indica que a presença dos polímeros aumenta a viscosidade dos SLCs. Isso pode ser explicado levando-se em consideração as inúmeras ligações intermoleculares que sucedem entre as cadeias poliméricas responsáveis pela viscosidade e o espessamento da formulação (VICTORELLI et al., 2018; CALIXTO et al., 2018; FONSECA – SANTOS et al., 2017; PERIOLI et al., 2008). Ademais, é possível verificar que a adição de 100% de muco decresce o índice de consistência (k), já que tornou a formulação menos viscosa, como é possível observar na análise visual das formulações na Figura 10. A formulação se tornando menos viscosa apresenta uma maior facilidade de ser eliminada do local de aplicação e essa é uma característica favorável, uma vez que é desejável que após um tempo da aplicação a formulação seja eliminada, possibilitando uma nova aplicação.

Os sistemas sem muco FW, FWC, FPC e FPCC em ambas as temperaturas apresentaram presença de tixotropia, isto é, a curva de volta (descendente) está desarticulada em um plano inferior à curva ascendente (FORMARIZ et al., 2006). A tixotropia indica que o sistema apresenta uma recuperação lenta do arranjo e consistência que fora perdida durante o cisalhamento e apresenta perfil de reconstrução tempo dependente, isto é, apresenta área de histerese, que indica a energia necessária para desestruturar a estrutura tixotrópica (SCHRAMM, 2006; CARVALHO et al., 2012; OLIVEIRA, et al., 2015).

Já nos sistemas FW30, FW30C, FW50, FW50C, FW100, FW100C, FPC30, FPC30C, FPC50, FPC50C, FPC100 e FPC100C em ambas as temperaturas os reogramas evidenciaram presença de reopexia, já que a curva descendente voltou acima da curva ascendente, no sentido anti-horário da curva (SCHRAMM, 2006). O comportamento reológico desses sistemas verificou que eles são dependentes de uma ação de cisalhamento para formar arranjos mais organizados (ISAAC et al., 2008).

O comportamento reológico (pseudoplástico e tixotrópico) das formulações FPC e FW é desejável uma vez que as formulações fluirão facilmente da seringa no momento da administração, facilitando assim a sua aplicação (CHORILLI et al., 2016). Além disso, a tixotropia permite que a viscosidade da formulação volte a aumentar após a diminuição da taxa de cisalhamento, permitindo que ela fique por mais tempo na mucosa vaginal e libere o fármaco por mais tempo, melhorando, assim, o desempenho clínico do tratamento (RAMOS et al., 2015).

4.2.3.2. Análise reológica oscilatória

Os ensaios oscilatórios podem apresentar informações em relação à natureza estrutural, uma vez que são capazes de avaliar o comportamento viscoelástico das formulações expondo-as a uma tensão de cisalhamento sinusoidal (DUMORTIER et al., 1991). Essas informações são adquiridas com a verificação do módulo de armazenamento (elástico) G' e do módulo de perda (viscoso) G'' . O G' representa a energia que é armazenada durante a deformação quando a tensão aumenta, e também a energia que é liberada quando a tensão cessa. Já o módulo G'' é o elemento viscoso que não é capaz de armazenar energia, visto que a tensão aplicada é dissipada (perdida) na forma de deformação irreversível (PÉNZES et al. 2004).

A partir dos reogramas obtidos nas Figuras 16 e 17 determinou-se que todas as formulações expostas à análise oscilatória tanto à $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ quanto a temperatura de $37,0^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ apresentaram G' maior que G'' , indicando que as formulações são mais elásticas do que viscosas ($G' > G''$) em todo intervalo de frequência estudado e portanto, apresentam características de sólido. A adição de muco vaginal artificial e fármaco não alteraram essa característica.

Esse comportamento é típico desse tipo de formulação e sugere que as formulações apresentam estruturas altamente organizadas e possuem fortes interações entre as moléculas (KARAVANA et al., 2009; CALIXTO et al., 2018).

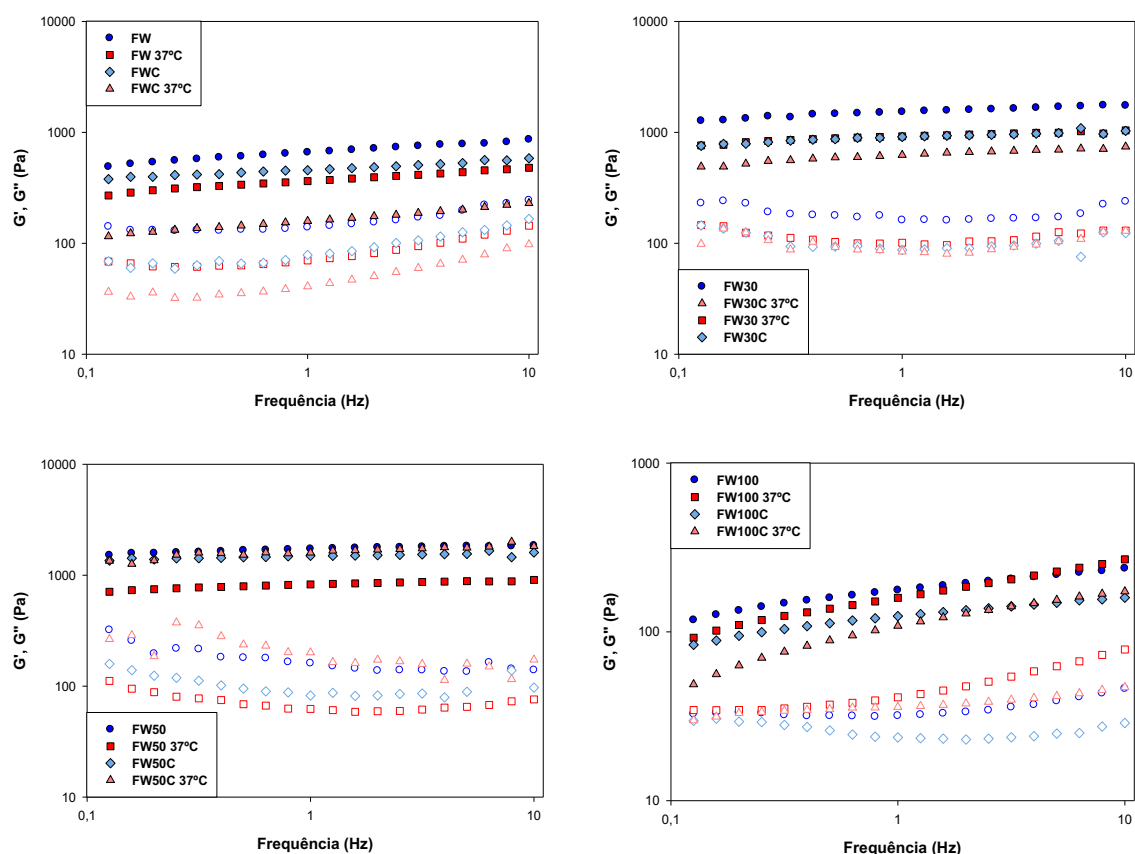


Figura 16. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência de FW, FWC, FW30, FW30C, FW50, FW50C, FW100 e FW100C à 25,0°C e 37,0°C. Abreviações: FW é a formulação composta por 40% Procetyl[®] AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa. FW30 é a formulação FW com adição de 30% muco. FW50 é a formulação FW com adição de 50% muco. FW100 é a formulação FW com adição de 100% muco. FWC é a formulação FW com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW30C é a formulação FW30 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW50C é a formulação FW50 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW100C é a formulação FW100 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. Os coeficientes de variação das análises em triplicata foram inferiores a 10% em todos os casos.

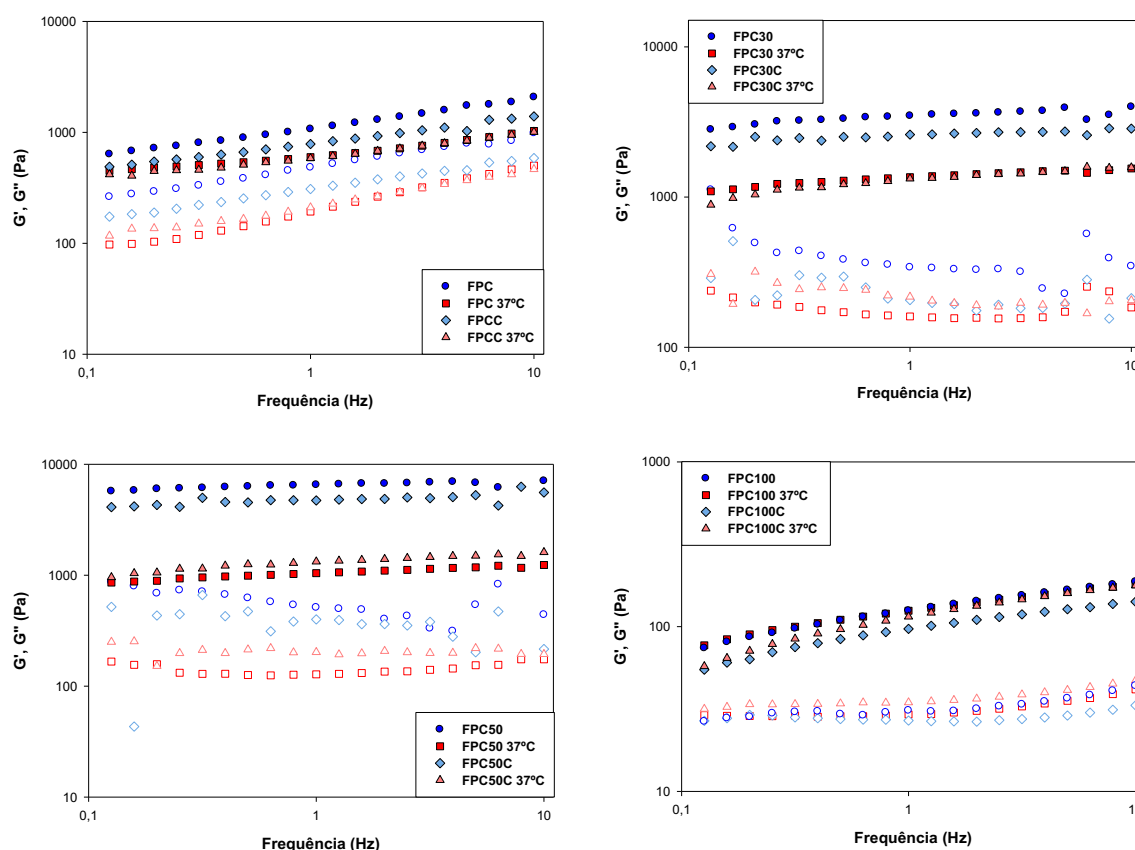


Figura 17. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolos cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência de FPC, FPCC, FPC30, FPC30C, FPC50, FPC50C, FPC100 e FPC100C à 25,0°C e 37,0°C. Abreviações: FPC é a formulação composta por 40% Procetyl[®] AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5%. FPC30 é a formulação FPC com adição de 30% muc. FPC50 é a formulação FPC com adição de 50% muc. FPC100 é a formulação FPC com adição de 100% muc. FPCC é a formulação FPC com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC30C é a formulação FPC30 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC50C é a formulação FPC50 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC100C é a formulação FPC100 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. Os coeficientes de variação das análises em triplicata foram inferiores a 10% em todos os casos.

De acordo com Saxena e colaboradores (2011), os parâmetros S e n indicam a densidade de reticulação no interior da amostra, visto que quanto mais alto for o valor de S , mais reticulada e forte será a estrutura da amostra. Ao contrário, o valor de n diminui com o aumento da densidade de reticulação. Dessa forma, valores de n altos revelam formulações com estruturas mais fracas.

Os valores de S e n estão apresentados na Tabela 6:

Tabela 6. Valores da resistência do gel (S) e do expoente viscoelástico (n) para as formulações FW, FW30, FW50, FW100, FWC, FW30C, FW50C, FW100C, FPC, FPC30, FPC50, FPC100, FPCC, FPC30C, FPC50C e FPC100C à 25,0°C e 37,0°C.

Temperatura		25,0°C		37,0°C	
Formulações	n	S	n	S	
FW	$0,12 \pm 0,00$	$650,17 \pm 3,38$	$0,12 \pm 0,00$	$360,82 \pm 1,64$	
FW30	$0,07 \pm 0,00$	$1506,71 \pm 7,44$	$0,07 \pm 0,00$	$901,82 \pm 5,71$	
FW50	$0,05 \pm 0,00$	$1693,48 \pm 9,49$	$0,05 \pm 0,00$	$813,27 \pm 3,02$	
FW100	$0,15 \pm 0,00$	$171,75 \pm 1,20$	$0,23 \pm 0,00$	$157,61 \pm 0,76$	
FWC	$0,09 \pm 0,00$	$460,39 \pm 1,51$	$0,15 \pm 0,00$	$159,00 \pm 0,68$	
FW30C	$0,07 \pm 0,01$	$893,78 \pm 6,52$	$0,09 \pm 0,00$	$612,16 \pm 3,58$	
FW50C	$0,03 \pm 0,00$	$1478,28 \pm 8,19$	$0,08 \pm 0,01$	$1598,46 \pm 17,57$	
FW100C	$0,14 \pm 0,01$	$119,90 \pm 0,92$	$0,26 \pm 0,01$	$102,28 \pm 1,65$	
FPC	$0,27 \pm 0,00$	$1084,86 \pm 5,38$	$0,20 \pm 0,01$	$623,53 \pm 6,38$	
FPC30	$0,06 \pm 0,01$	$3377,27 \pm 42,18$	$0,07 \pm 0,00$	$1327,48 \pm 8,78$	
FPC50	$0,00 \pm 0,10$	$5652,00 \pm 752,80$	$0,08 \pm 0,00$	$1032,49 \pm 4,43$	
FPC100	$0,20 \pm 0,01$	$121,61 \pm 0,91$	$0,18 \pm 0,00$	$121,68 \pm 0,86$	
FPCC	$0,24 \pm 0,01$	$787,98 \pm 8,69$	$0,21 \pm 0,00$	$597,65 \pm 4,13$	
FPC30C	$0,05 \pm 0,01$	$2537,18 \pm 21,15$	$0,11 \pm 0,01$	$1264,67 \pm 12,03$	
FPC50C	$0,06 \pm 0,01$	$4722,35 \pm 80,32$	$0,10 \pm 0,01$	$1281,4 \pm 10,80$	
FPC100C	$0,20 \pm 0,01$	$92,88 \pm 0,98$	$0,23 \pm 0,01$	$109,37 \pm 1,46$	

Analisando as Tabela 6 foi possível verificar que as formulações FPC sem muco e com adição de 30% e 50% de muco vaginal artificial mostraram valores maiores de S em ambas as temperaturas estudadas, confirmando que a adição dos polímeros QS e PEI e de muco na concentração de 30% e 50% favoreceu a formação de estruturas mais reticuladas e fortes e consequentemente em maior resistência dessas formulações à deformação (KARAVANA et al., 2009). De maneira geral, os valores de S e n dos SLCs estão em concordância com as evidências dos gráficos de G' e G'' .

Levando em consideração a formulação FW e FPC foi possível observar que a incorporação do fármaco contribuiu para uma diminuição do valor de S em ambas as temperaturas analisadas. Este resultado sugere que a adição de CUR tende a deixar as formulações menos organizadas (SALMAZI et al., 2015).

Ademais, é possível verificar na Tabela 6 que a formulação FW e FPC com adição de 100% de muco apresentou os menores valores de S e maiores valores de n , o que indica uma diminuição na densidade de reticulação da formulação, formando estruturas mais fracas (CARVALHO et al., 2010).

Em um modo geral, as amostras analisadas à 25,0°C apresentaram um valor de S maior daquelas analisadas à 37,0°C, indicando que a elevação da temperatura contribuiu para a formação de estruturas mais fracas.

4.2.4. Análise de perfil de textura

O perfil de textura de um produto pode ser medido através de diversas técnicas, sendo as mecânicas as mais conhecidas para caracterização de produtos farmacêuticos, uma vez que possibilitam determinar parâmetros, como adesividade, compressibilidade, dureza e coesão (TAI et al, 2014).

A adesividade fundamenta-se no trabalho (área negativa) efetuado para suportar as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da sonda, com a qual a amostra entra em contato. Desta forma é possível prever a capacidade dos sistemas em se aderir a uma superfície específica (JONES et al., 1996).

Os valores de compressibilidade e dureza mostram a facilidade de aplicação do produto no local desejado. A compressibilidade se baseia no trabalho (força x tempo) executado para deformar o material durante essa primeira compressão, avaliando-se a capacidade de extrusão da formulação do recipiente de embalagem e o grau de espalhabilidade das formulações na mucosa por meio desses parâmetros (CALIXTO *et al.*, 2015). Já a dureza revela a resistência do material a deformações e é determinada por meio da força máxima executada pela sonda na primeira compressão (SENYIGIT et al., 2011). Já

Por fim, é possível verificar a recuperação estrutural da formulação após sua aplicação avaliando a coesão, que poderá indicar a estabilidade da formulação (VICTORELLI et al., 2018). Esse parâmetro é determinado através da razão entre a área resultante da segunda compressão e a área avaliada na primeira compressão (EXPONENT LITE, 2009).

Sendo assim, a análise do perfil de textura dos cristais líquido obtidos é muito relevante, uma vez que é possível determinar se os parâmetros mecânicos encontrados são convenientes para a aplicação desejada. Na Figura 18 é possível verificar os resultados dos perfis de textura obtidos para as formulações em questão.

Conforme os resultados apresentados foi possível averiguar que a adição dos polímeros QS e PEI levou a um grande aumento no valor dos parâmetros de dureza, compressibilidade e adesividade. Os polímeros utilizados são catiônicos e provocam aumento da viscosidade em consequência ao aumento da carga positiva dos sistemas e ao aumento do número de ligações intermoleculares que ocorrem entre as cadeias de polímeros. Este fato indica uma organização maior desses sistemas como observado nos testes de reologia (VICTORELLI et al., 2018; CALIXTO et al., 2016; GRATIERI et al., 2010; PERIOLI et al., 2008).

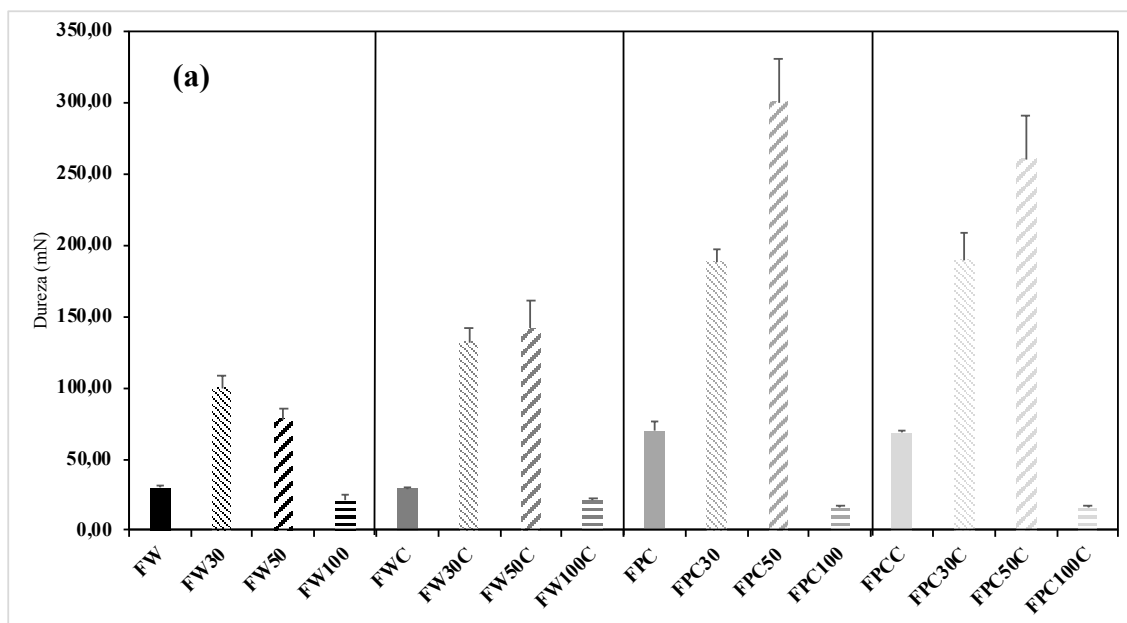
Foi possível observar que a presença de muco nas concentrações de 30% e 50% também aumentou as propriedades mecânicas de adesividade, compressibilidade e dureza, dos sistemas,

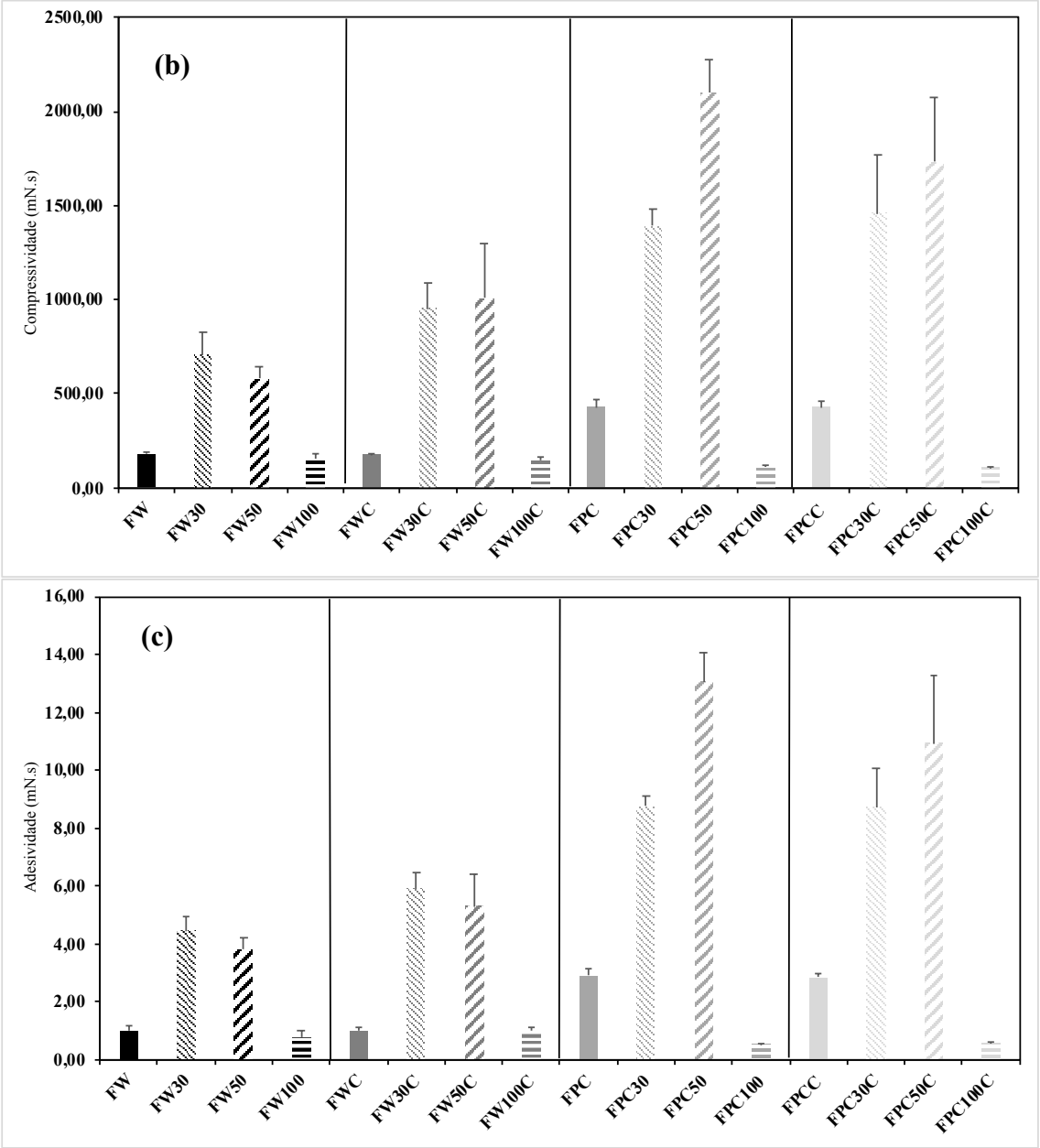
uma vez que estas ficaram mais viscosas.

A adição da CUR aumentou significativamente os valores de dureza, compressividade e adesividade apenas para a formulação FW acrescida de 30 e 50 % de muco e diminuiu apenas para a formulação FPC acrescida de 50% de muco.

Como a compressibilidade indica o trabalho necessário para quebrar as ligações físicas das formulações o aumento do valor desse parâmetro mostra que as estruturas das formulações possuem ligações rígidas entre si, o que causa um aumento na estabilidade física da formulação (MERINO-BOHÓRQUEZ et al., 2015).

Todas as formulações acrescidas ou não de muco e fármaco se apresentaram coeso, isto é, apresentaram ligações fortes entre as moléculas e após a deformação ocorreu uma recuperação estrutural das formulações.





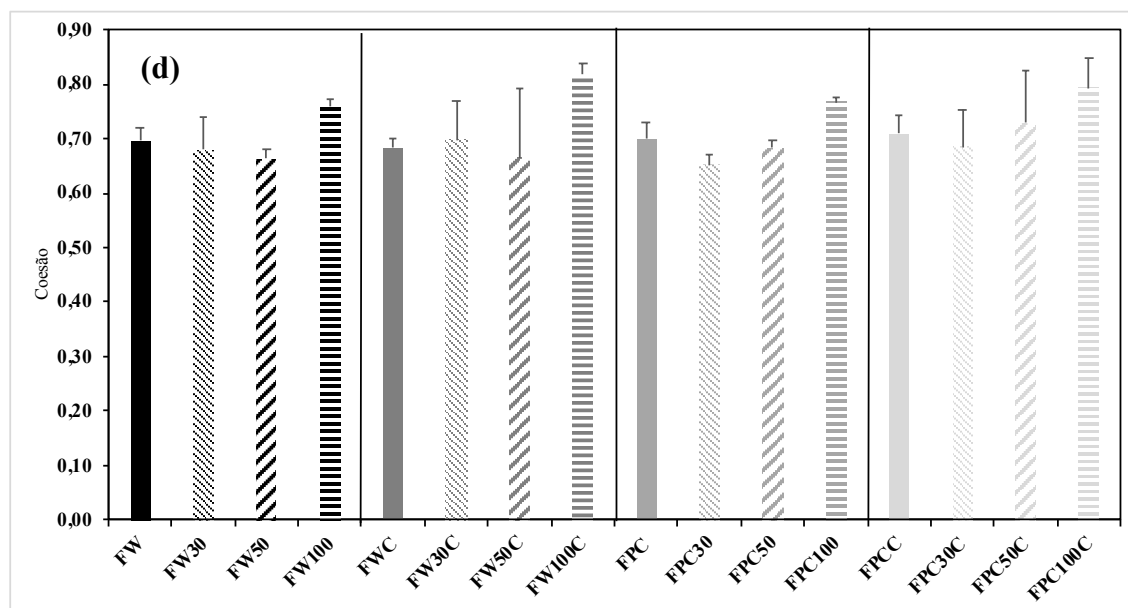


Figura 18. Perfil de textura das formulações FW e FPC com e sem adição de muco 30%, 50%, 100% e CUR. A Figura (a) indica a dureza das formulações, (b) indica a compressividade, (c) a adesividade e (d) a coesão. Abreviações: FW é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa. FW30 é a formulação FW com adição de 30% de muco. FW50 é a formulação FW com adição de 50% de muco. FW100 é a formulação FW com adição de 100% de muco. FWC é a formulação FW com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW30C é a formulação FW30 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW50C é a formulação FW50 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW100C é a formulação FW100 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5%. FPC30 é a formulação FPC com adição de 30% de muco. FPC50 é a formulação FPC com adição de 50% de muco. FPC100 é a formulação FPC com adição de 100% de muco. FPCC é a formulação FPC com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC30C é a formulação FPC30 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC50C é a formulação FPC50 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC100C é a formulação FPC100 com adição de 0,5 mg/g de curcumina.

4.2.5. Estudo *in vitro* de mucoadesão

Conforme os dados apresentados na Figura 19, notou-se que os valores de força e de trabalho mucoadesivo mostraram-se maiores para a formulação contendo QS e PEI (FPC) em relação à formulação sem estes polímeros (FW), enfatizando que a inclusão de QS e PEI aumentou consideravelmente a interação do cristal líquido com a mucosa vaginal. Esse resultado pode ser explicado pelo fato da QS e da PEI apresentarem alta densidade de carga catiônica assim, podendo aumentar a interação por forças de atração da formulação com as superfícies carregadas negativamente (GUNTHER et al., 2011), como a mucosa vaginal e portanto apresentando propriedades mucoadesivas (CALIXTO et al., 2018).

Ademais, a adição de muco 30%, 50% e 100% com e sem a adição de CUR aumentou a força e o trabalho mucoadesivo para a formulação FW. Já para a formulação FPC a adição do muco nas proporções de 30% e 50% com e sem adição de CUR contribuiu apenas para o aumento da força mucoadesiva enquanto que a adição do muco na proporção de 100% com e sem adição de CUR não apresentou mudanças significativas para a força mucoadesiva. O

trabalho mucoadesivo diminuiu para a formulação FPC com a adição do muco na proporção de 30% com e sem adição de CUR e aumentou com a adição do muco na proporção de 50% com e sem adição de CUR. A adição de muco na proporção de 100% sem adição de CUR não mostrou mudança significativa do trabalho mucoadesivo da formulação FPC, já com a adição da CUR houve uma diminuição do trabalho mucoadesivo.

Salmazi et al. (2015) verificou a força mucoadesiva de um sistema precursor de cristal líquido formado por ácido oleico, álcool cetílico etoxilado 20 e propoxilado 5 e dispersão de quitosana com adição de poloxamer, utilizando mucosa vaginal. Eles observaram que a adição de muco na concentração de 30% e 100% aumentou a força mucoadesiva da formulação. O mesmo foi observado por Ramos et al. 2015. Eles verificaram que a adição de muco no sistema precursor de cristal líquido formado também por procetyl, ácido oleico e dispersão polimérica aumentou os parâmetros mucoadesivos.

Estas descobertas demonstram que a incorporação de polímeros mucoadesivos, como a QS e PEI na formulação, além de aumentar a viscosidade, também aumenta as características mucoadesivas da formulação. Estas características conferem vantagens nas formulações desenvolvidas, pois um maior valor de mucoadesão pode indicar um maior tempo de contato da formulação com a mucosa, prolongando a absorção do fármaco e sua ação (SMART et al., 2003).

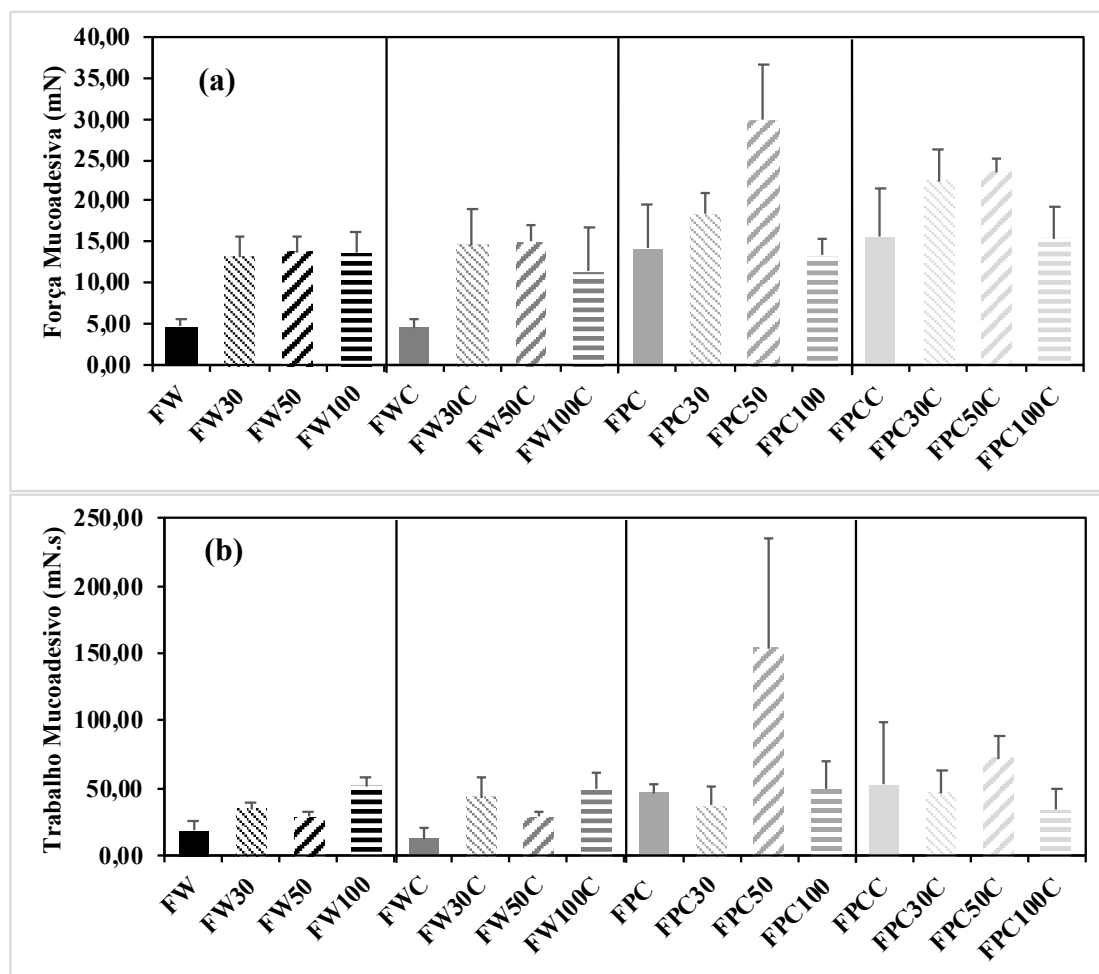


Figura 19. (a) força e (b) trabalho de mucoadesividade das formulações FW, FW30, FW50, FW100, FWC, FW30C, FW50C, FW100C, FPC, FPC30, FPC50, FPC100, FPCC, FPC30C, FPC50C, FPC100C à temperatura de 37,0°C. Abreviações: FW é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa. FW30 é a formulação FW com adição de 30% de muco. FW50 é a formulação FW com adição de 50% de muco. FW100 é a formulação FW com adição de 100% de muco. FWC é a formulação FW com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW30C é a formulação FW30 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW50C é a formulação FW50 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FW100C é a formulação FW100 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5%. FPC30 é a formulação FPC com adição de 30% de muco. FPC50 é a formulação FPC com adição de 50% de muco. FPC100 é a formulação FPC com adição de 100% de muco. FPCC é a formulação FPC com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC30C é a formulação FPC30 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC50C é a formulação FPC50 com adição de 0,5 mg/g de curcumina. FPC100C é a formulação FPC100 com adição de 0,5 mg/g de curcumina.

4.3. Validação da metodologia analítica para quantificação de curcumina por cromatografia líquida de alta eficiência

4.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico

Para a análise da adequabilidade do sistema cromatográfico foi feita a leitura de 6 replicatas na concentração de 25 µg/mL de CUR e feito os cálculos da média e desvio padrão relativo dos itens a seguir: área do pico de CUR e fator de retenção, fator de capacidade (K), fator de cauda

(T) , número de pratos da coluna (N) e assimetria do pico. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos.

Tabela 7. Parâmetros investigados para determinar a conformidade do sistema cromatográfico empregado para análise da CUR.

Injeções	Área	TR	K	Fator de cauda (T)	Número pratos (N)	Assimetria
1	3426,8	8,585	3,189	1,217	9376,00	0,770
2	3475,0	8,581	3,187	1,211	9289,00	0,768
3	3431,1	9,083	3,398	1,228	7350,00	0,771
4	3467,7	9,091	3,392	1,208	7464,00	0,785
5	3554,1	9,096	3,396	1,194	7362,00	0,787
6	3446,8	9,088	3,394	1,184	7447,00	0,788
Média	3466,9	8,921	3,326	1,207	8048,00	0,778
DP	46,8	0,262	0,107	0,016	996,37	0,009
D.P.R %	1,4	2,933	3,214	1,310	12,38	1,194

TR: tempo de retenção (min); DP: desvio padrão e D.P.R: desvio padrão relativo.

O número de pratos da coluna foi superior a 2000, como requerido, e as médias dos valores de assimetria e fator de cauda estão abaixo do valor preconizado de 2. Além disso, foi verificado a precisão nos valores obtidos da área do pico e tempo de retenção, com valor de D.P.R < 5% (FDA, 1994; ICH, 2005; USP 33, 2010), como mostra a Tabela 7. Assim, os resultados obtidos demonstraram que o método e o equipamento empregados para efetuar as análises são apropriados, certificando a confiabilidade dos resultados. A resolução e a simetria do pico referente a CUR, com tempo de retenção de 9,083 minutos foi evidenciado pelo cromatograma obtido pelo método sugerido (Figura 20).

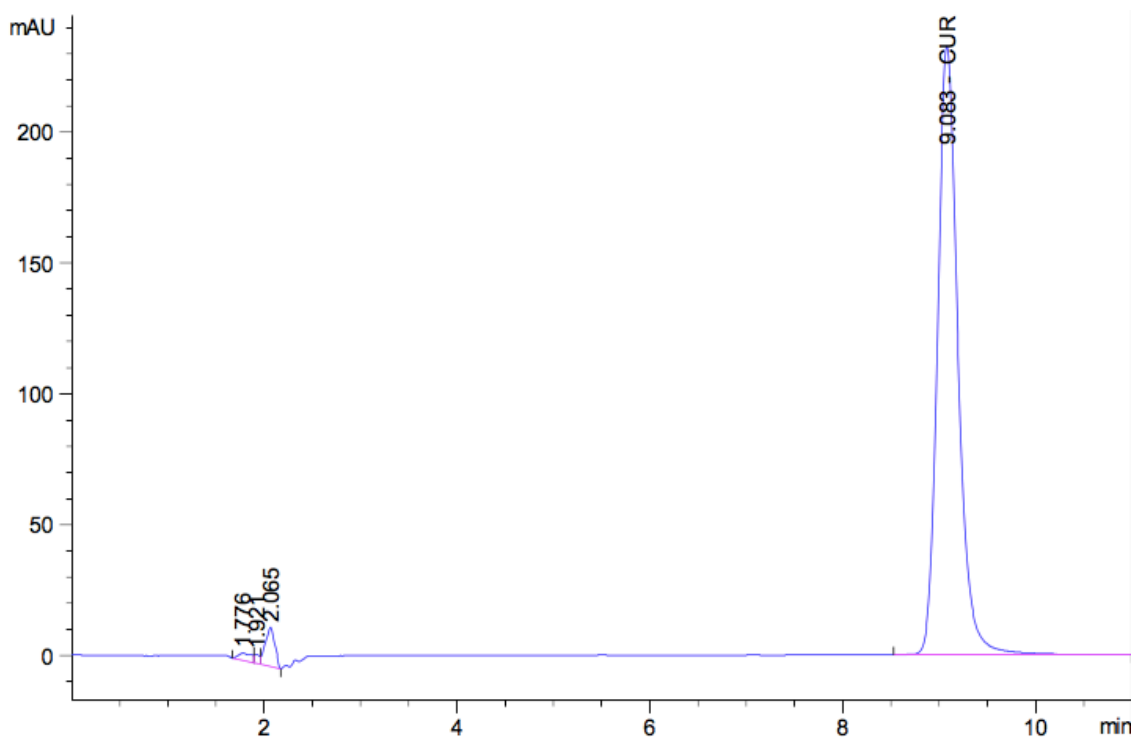


Figura 20. Cromatograma da CUR obtido pelo método cromatográfico proposto. Abreviações: CUR, curcumina.

4.3.2. Seletividade

Para garantir a seletividade do método injetou-se os componentes da fase móvel (ácido acético 2% e acetonitrila), as formulações FW e FPC não contendo CUR diluídas em metanol e meio receptor e mucosa vaginal triturada em metanol. Os resultados indicaram que os componentes da fase móvel, as formulações sem o fármaco e a mucosa vaginal não interferiram na análise da CUR, já que não revelaram picos cromatográficos iguais com o tempo de retenção específico do mesmo, como exibe a Figura 21 (a-f).

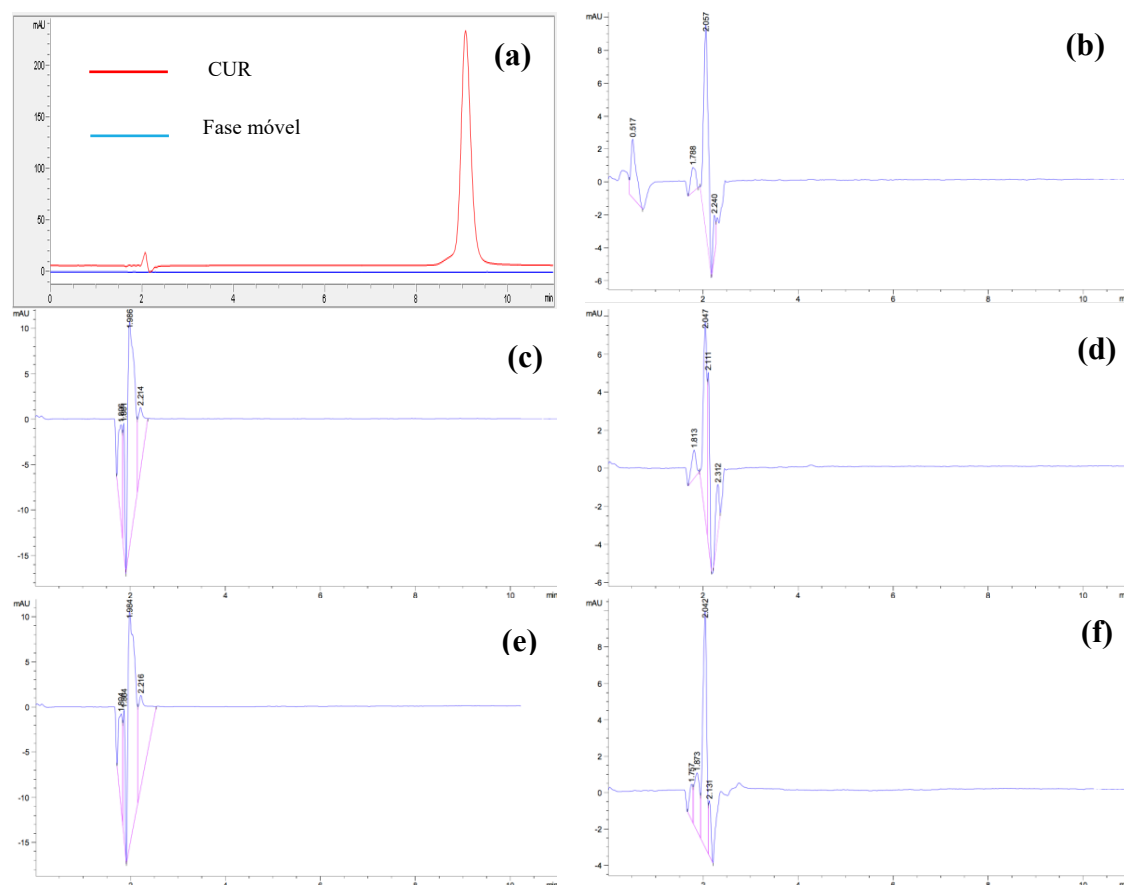


Figura 21. (a) Cromatograma da fase móvel (50% acetonitrila e 50% ácido acético 2%); (b) Cromatograma FW diluída em metanol; (c) Cromatograma FW diluída em meio receptor; (d) Cromatograma FPC diluída em metanol; (e) Cromatograma FPC diluída em meio receptor; (f) Cromatograma mucosa em metanol. Abreviações: FW é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa. FPC é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5%.

4.3.3. Linearidade

Para o estudo da regressão linear com base no método dos mínimos quadrados foi empregada as médias obtidas das áreas dos picos cromatográficos. Os valores das áreas dos picos apresentaram-se diretamente proporcionais às concentrações de CUR, dentro do intervalo analisado, garantindo que o método aplicado é linear na faixa de 0,5 a 70 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos por meio da injeção das oito concentrações do padrão de CUR em metanol em triplicata encontram-se na Tabela 8 e a Figura 22 demonstra a curva analítica obtida onde é possível observar a linearidade dos resultados, já que o coeficiente de correlação encontrado foi de 1,000.

Tabela 8. Valores das áreas referentes ao pico de CUR em metanol para obtenção da curva analítica por CLAE.

CUR (µg/mL)	Área	Área média ± Dp ^a	CV ^b (%)
0,5	69,50	66,77 ± 3,23	4,84
	67,60		
	63,20		
1,0	144,90	141,63 ± 2,83	2,00
	140,10		
	139,90		
2,5	329,80	342,00 ± 10,60	3,10
	347,20		
	349,00		
5,0	703,90	683,17 ± 18,33	2,68
	676,50		
	669,10		
10,0	1391,60	1357,20 ± 49,96	3,68
	1299,90		
	1380,10		
25,0	3426,80	3444,30 ± 26,67	0,77
	3475,00		
	3431,10		
50,0	6858,40	6943,10 ± 74,74	1,08
	6971,10		
	6999,80		
70,0	9725,00	9704,53 ± 76,09	0,78
	9620,30		
	9768,30		

^aDP= Desvio Padrão/ ^bCV= Coeficiente de variação

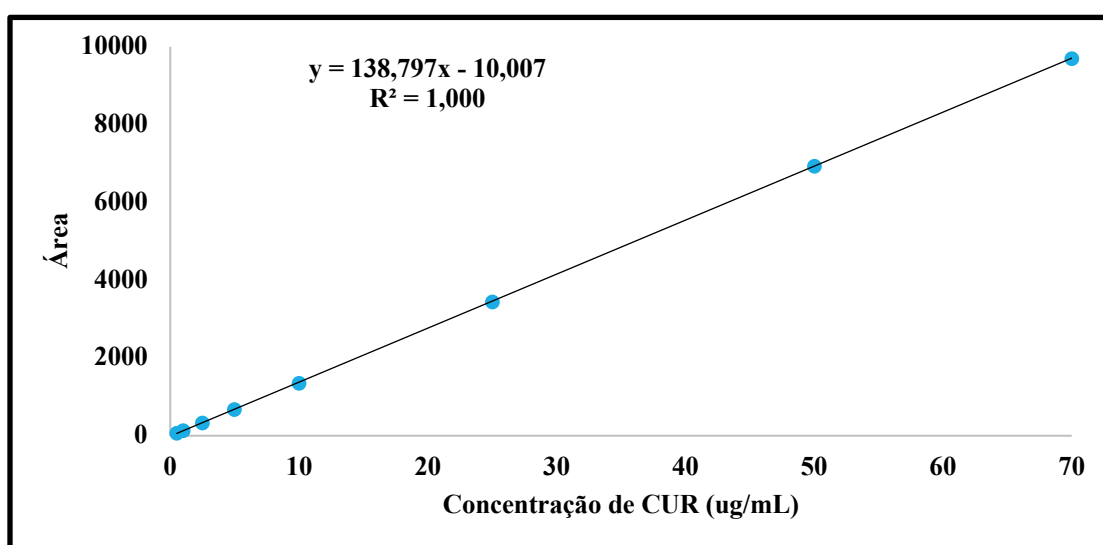


Figura 22. Curva analítica da CUR em metanol obtida pelo método cromatográfico. Fase móvel: ácido acético 2% e acetonitrila (50:50 v/v); Coluna: C18-Eclipse (4,6 mm x 250mm) 5 µm; Vazão: 1,2 mL/min.; λ: 425 nm; Injeção: 20µL; 33°C. Abreviações: CUR, curcumina.

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos por meio da injeção das oito concentrações do padrão de CUR em meio receptor em triplicata e a Figura 23 demonstra a curva analítica obtida onde é possível verificar a linearidade dos resultados, uma vez que o coeficiente de correlação encontrado foi de 1,000.

Tabela 9. Valores das áreas referentes ao pico de CUR em meio receptor para obtenção da curva analítica por CLAE.

CUR (µg/mL)	Área	Área média $\pm$ Dp ^a	CV ^b (%)
0,5	51,70	53,70 $\pm$ 2,68	4,98
	53,70		
	57,00		
1,0	114,20	114,20 $\pm$ 5,09	4,46
	108,00		
	118,10		
2,5	299,30	305,70 $\pm$ 9,81	3,21
	318,56		
	305,70		
5,0	649,20	649,20 $\pm$ 19,47	3,00
	666,14		
	627,30		
10,0	1269,70	1269,70 $\pm$ 37,90	2,98
	1326,95		
	1255,30		
25,0	3095,20	3253,23 $\pm$ 93,29	2,87
	3253,23		
	3260,10		
50,0	6446,00	6547,40 $\pm$ 193,98	2,96
	6821,01		
	6547,40		
70,0	8882,30	9006,50 $\pm$ 250,54	2,78
	9364,80		
	9006,50		

^aDP= Desvio Padrão/ ^bCV= Coeficiente de variação

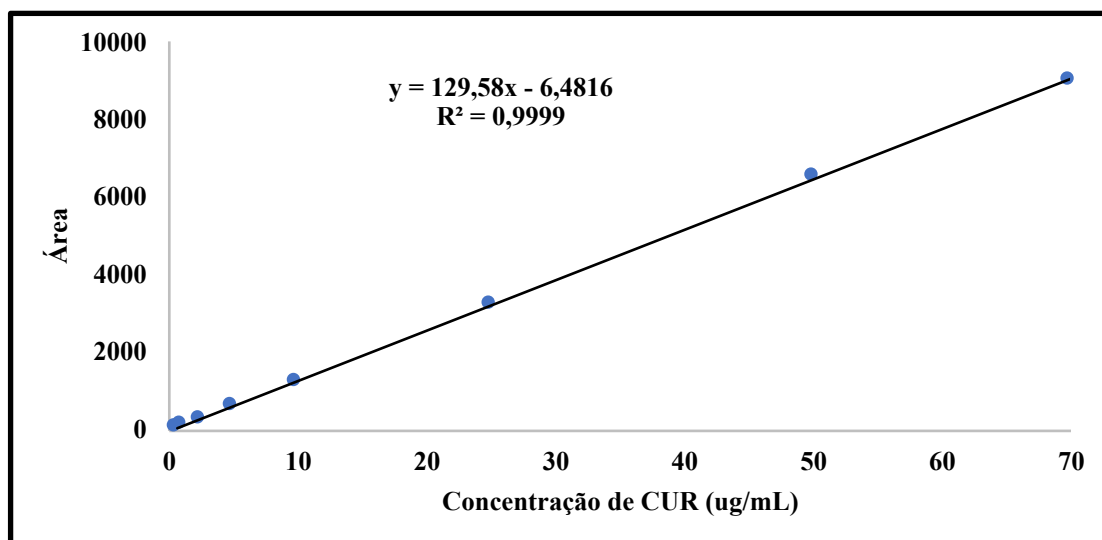


Figura 23. Curva analítica da CUR em meio receptor obtida pelo método cromatográfico. Fase móvel: ácido acético 2% e acetonitrila (50:50 v/v); Coluna: C18-Eclipse (4,6 mm x 250mm) 5 µm; Vazão: 1,2 mL/min.; λ: 425 nm; Injeção: 20µL; 33°C. Abreviações: CUR, curcumina.

Para a linearidade em metanol e em meio receptor, a análise de variância ANOVA certificou que a regressão linear é significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$). Além disso, essa análise confirmou que não há diferença significativa entre as inclinações das três curvas analíticas (Desvio da Linearidade) ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$) por meio dos dados obtidos no intervalo de 95% de confiança (Tabelas 10 e 11) (PINTO et al., 2017).

Tabela 10. Análise de variância dos valores das áreas obtidos na construção da curva analítica de CUR em metanol.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	7	277154663,19	39593523,31	21045,46	2,66
Regressão Linear	1	277145883,34	277145883,34	147313,58	4,49
Desvio da Linearidade	6	8779,85	1463,31	0,78	2,74
Dentro (Resíduo)	16	30101,33	1881,33	-	-
Total	23	277184764,52	-	-	-

Tabela 11. Análise de variância dos valores das áreas obtidos na construção da curva analítica de CUR em meio receptor.

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	7	245646786,39	35092398,06	2528,16	2,66
Regressão Linear	1	245503976,84	245503976,84	17686,81	4,49
Desvio da Linearidade	6	142809,55	23801,59	1,71	2,74
Dentro (Resíduo)	16	222090,02	13880,63	-	-
Total	23	245868876,40	-	-	-

4.3.4. Precisão

Os resultados de várias leituras de uma mesma amostra devem ser semelhantes entre eles, indicando que o método é preciso e garantindo a confiabilidade das análises do fármaco (BRASIL, 2017).

A precisão foi verificada por meio do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

4.3.4.1 Repetibilidade

Foi utilizado três concentrações, baixa, média e alta (2,5, 25,0 e 70,0 µg/mL) e os resultados foram apresentados baseando-se no coeficiente de variação. As leituras foram realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista. As análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que o método é preciso, já que o valor de CV% para todas as concentrações utilizadas no ensaio de precisão intracorrida foi inferior à 5%, como requerido pela legislação atual.

Tabela 12. Determinação da precisão intracorrida (Repetibilidade) de CUR no metanol por CLAE.

CUR (µg/mL)	Área	Área média ± Dp ^a	CV ^b (%)
2,50	317,40	331,47 ± 14,97	4,52
	329,80		
	347,20		
25,00	3535,70	3479,17 ± 54,57	1,57
	3426,80		
	3475,00		
70,00	9776,20	9707,17 ± 79,47	0,82
	9725,00		
	9620,30		

^aDesvio Padrão / ^bCV = Coeficiente de variação

4.3.4.2. Precisão intermediária

Foi utilizado três concentrações, baixa, média e alta (2,5, 25 e 70 µg/mL) e os resultados foram apresentados baseando-se no coeficiente de variação. As leituras foram efetuadas em dois dias diferentes, com analistas diferentes e utilizando o mesmo equipamento.

Os resultados exibidos na Tabela 13 comprovam que o método é preciso, já que o valor de CV% para todas concentrações utilizadas no ensaio de precisão intercorridas foi inferior à 5%, como requerido pela legislação atual.

Tabela 13. Determinação da precisão intermediária de CUR no metanol por CLAE.

Dia	Analista	CUR (µg/mL)	Área média ± Dp^a	CV^b (%)	CV (%) geral
1	A	2,50	331,47 ± 14,97	4,52	1,6
		25,00	3479,17 ± 54,57	1,57	
		70,00	9707,17 ± 79,47	0,82	
	B	2,50	321,03 ± 11,21	3,49	
		25,00	3359,87 ± 72,19	2,15	
		70,00	9699,07 ± 50,39	0,52	
2	A	2,50	351,87 ± 5,31	1,51	
		25,00	3456,20 ± 10,61	0,31	
		70,00	9907,97 ± 28,44	0,29	
	B	2,50	338,40 ± 7,38	2,18	
		25,00	3508,70 ± 9,11	0,26	
		70,00	9708,80 ± 171,29	1,76	

^aDesvio Padrão/ ^b CV= coeficiente de variação

4.3.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico corresponde ao grau de concordância entre os resultados individuais alcançados em um mesmo ensaio e um valor de referência considerado como verdadeiro (INMETRO, 2003). Variações na faixa de trabalho entre 80-120% são aceitas pela RDC nº166 de 2017, porém é aconselhável a obtenção de valores próximos a 100% (BRASIL, 2017). Os valores obtidos, de acordo com as Tabelas 14 e 15 apresentam-se dentro dos limites requeridos, comprovando que o método usado é exato.

Tabela 14. Exatidão do método analítico para análise de CUR na FW e FPC em metanol.

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média experimental (µg/mL)	Exatidão (%)
FW	2,50	2,44	97,5
FW	25,00	24,86	99,4
FW	70,00	71,12	101,6
FPC	2,50	2,68	107,2
FPC	25,00	24,57	98,3
FPC	70,00	69,83	99,8

Tabela 15. Exatidão do método analítico para análise de CUR na FW e FPC em meio receptor.

Formulação	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média experimental (µg/mL)	Exatidão (%)
FW	2,5	2,19	87,5
FW	25	23,70	94,8
FW	70	68,94	98,5
FPC	2,5	2,74	109,8
FPC	25	24,73	98,9
FPC	70	70,89	101,3

4.3.6. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) sugerem a sensibilidade do método analítico. Os valores de LD e de LQ foram calculados conforme as equações representadas nos itens 3.2.4.5 e 3.2.4.6 e para o metanol corresponderam a 0,126 µg/mL e 0,381 µg/mL, respectivamente, e para o meio receptor corresponderam a 0,168 µg/mL e 0,510 µg/mL comprovando a capacidade do método de detectar e quantificar baixas concentrações de CUR.

4.3.7. Doseamento do fármaco no sistema líquido cristalino

A quantidade de CUR incorporado no cristal líquido diluído em metanol está apresentado na Tabela 16. Foi possível verificar que o teor de fármaco nas formulações varia entre 99,02% e 100,49%, mostrando que os valores determinados experimentalmente são próximos aos valores teóricos de fármaco que foi incorporado nas formulações retratando a eficiência da técnica de preparo.

Tabela 16. Doseamento da CUR nos SLCs.

Formulação	Concen- tração teórica (µg/mL)	Área	Área média ± Dp ^a	Concentração média experimental (µg/mL)	Teor (%)
FW	50,00	6925,2			
FW	50,00	6925,2	6861,77 ± 57,43	49,51	99,02
FW	50,00	6846,8			
FPC	50,00	6973,8			
FPC	50,00	6943,5	6964,07 ± 17,82	50,25	100,49
FPC	50,00	6974,9			

^aDesvio Padrão/ ^b CV= coeficiente de variação

4.4. Ensaio de liberação, permeação e retenção *in vitro*

4.4.1. Avaliação da cinética de liberação *in vitro* da curcumina

O estudo do perfil de liberação da CUR a partir dos SLCs foi capaz de indicar quanto do fármaco foi liberada em função do tempo, e também o mecanismo envolvido nesse processo.

As formulações FW e FPC e o fármaco livre contendo 0,5% de CUR foram utilizados para a realização dos testes de liberação *in vitro*. O objetivo deste experimento foi de verificar o perfil de liberação da CUR a partir das formulações e livre através da membrana poliétersulfona 0,45 μm .

A Figura 24 indica que as taxas de liberação de CUR a partir das formulações FWC e FPCC foram muito semelhantes, demonstrando que a adição dos polímeros QS e PEI não interferiu no perfil de liberação do fármaco nos SLCs. As formulações liberaram 7,04% e 7,79% de CUR respectivamente e foi possível verificar que as formulações conseguem controlar a velocidade de liberação do fármaco. A liberação do fármaco suspenso em ácido oleico foi menor do que a das formulações, liberando 4,20% em 12 horas. Porém foi possível observar que a CUR estava suspensa no ácido oleico e durante o ensaio a CUR foi se sedimentando sobre a membrana impossibilitando a passagem do fármaco.

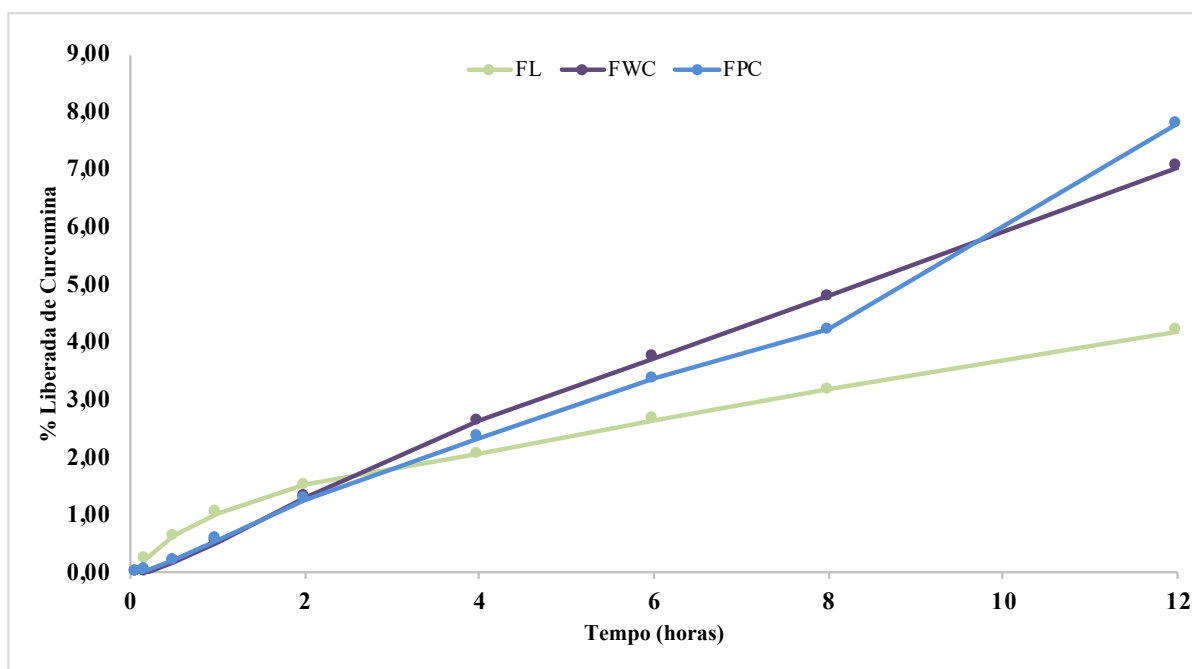


Figura 24. Perfil de liberação *in vitro* (%), com membrana de poliétersulfona 0,45 μm , de CUR incorporada nas formulações FW, FPC contendo CUR 0,5% e suspensão contendo CUR 0,5% (FL). Abreviações: CUR, curcumina. FW é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa. FPC é a formulação composta por 40% Procetyl® AWS, 20% de ácido oleico e 40% de fase aquosa composta pela dispersão de quitosana 2,5% e polietilenomina 2,5%. Os coeficientes de variação das análises foram inferiores a 10% em todos os casos.

Os fenômenos que explicam a liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação são muito complexos, de modo que o estudo matemático da cinética de liberação pode fornecer dados para uma melhor compreensão dos perfis de liberação do fármaco (COSTA et al., 2001). Pode-se investigar qual modelo de liberação (Korsmeyer-Peppas, Baker & Lonsdale, Higuchi, Hixon & Crowell, Weibull e Primeira Ordem) é mais adequado para as formulações desenvolvidas.

Como a CUR é muito lipofílica e apresenta um logP alto o nosso grupo de pesquisa obteve melhores resultados utilizando a membrana de polietersulfona. Porém, essa membrana apresenta uma barreira física para a passagem da CUR e esta barreira não está presente nos sistemas *in vivo*. Portanto, é possível verificar em alguns trabalhos que o resultado da liberação da CUR mesmo utilizando a membrana de polietersulfona contradiz o resultado *in vivo* indicando que o resultado do ensaio de liberação nos mostra apenas um perfil de liberação e não o valor que realmente é liberado das formulações, tornando o estudo matemático da cinética de liberação inválido.

Rodero e colaboradores (2018) verificaram que a CUR em solução liberou em torno de 38% em 12 horas e que os SLCs liberaram menos que 10% de CUR através da membrana de polisulfona. Entretanto, nos experimentos *in vitro* e *in vivo* foi possível observar que o SLC com CUR incorporada apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e foi mais efetivo para o controle da infecção vaginal mesmo apresentando uma baixa taxa de liberação de CUR. Isso sugere que a baixa taxa de liberação da CUR das formulações provavelmente se deve a membrana utilizada no experimento.

4.4.2. Ensaio de permeação e retenção *in vitro* da curcumina

Os experimentos de permeação e retenção são realizados com o objetivo de avaliar as interações que a formulação apresenta quando em contato com a mucosa, podendo demonstrar como será realizada a difusão do fármaco e verificar se o fármaco ficará retido ou não na mucosa.

Foi possível verificar que o fármaco não permeou a mucosa vaginal no experimento com o FL, FW e FPC.

A Tabela 17 apresenta a quantidade de fármaco (%) que ficou retida na mucosa.

Tabela 17. Comparação da retenção na mucosa da CUR entre as amostras.

Sistemas	Retenção (%)
FL	11,83 ± 9,46
FW	2,54 ± 1,14
FPC	2,14 ± 2,03

Os estudos de retenção mostraram que a CUR livre reteve mais quantidade de fármaco na mucosa vaginal do que as formulações FW e FPC. Isso se deve ao fármaco ser liberado mais rapidamente e em maior quantidade em FL como foi observado no teste de liberação e também porque a CUR se sedimentou sobre a mucosa. A porcentagem retida por FPC e FW foi muito semelhante.

Dessa forma é possível sugerir que ambas as formulações são convenientes para administração tópica, onde um efeito local do fármaco como a CUR é desejado.

Salmazi et al. (2015) incorporaram CUR em sistemas precursores de cristal líquido para o tratamento local de candidíase vaginal, sendo que a formulação com CUR foi mais potente contra a *Candida albicans* do que a curcumina em solução. Roderio et al. (2018) mostraram que a CUR incorporada no SLC desenvolvido foi mais eficaz no controle da infecção vaginal *in vivo* causada pela *Candida albicans* do que com o tratamento com fluconazol e além disso, a formulação com CUR foi eficaz na modulação da reação inflamatória associada à infecção. Fonseca-Santos et al. (2016) desenvolveram um SLC carregado com CUR para o tratamento local de doenças de pele e foi possível observar que a formulação com CUR apresentou atividade anti-inflamatória em comparação com o controle positivo em um experimento de inflamação *in vivo*.

4.5. Ensaio de citotoxicidade

4.5.1. Teste de citotoxicidade por difusão em meio ágar *in vitro* em linhagem celular fibroblastos (L929) e de câncer cervical (Hela)

A biocompatibilidade e citotoxicidade *in vitro* das formulações FW, FPC, FWC e FPCC foram determinadas através do teste por difusão em ágar que fornece informações qualitativas por sobreposição indireta, estabelecidas na ISO 10993-5.

A L929 é uma linhagem de fibroblasto de camundongo e foi utilizada para verificar a biocompatibilidade das formulações com células normais. Já para verificar o efeito citotóxico para o câncer cervical foram utilizadas células Hela.

O halo foi dividido em 4 quadrantes, a partir do disco de papel filtro contendo as amostras. Os quadrantes foram mensurados visualmente, através de transparências milimetradas sob as placas e paquímetro, e então registradas.

A medida de extensão de cada quadrante é mostrada na Tabela 18. As médias quantitativas de citotoxicidade obtidas para cada formulação foram aplicadas à tabela de graus de citotoxicidade mostrada na Tabela 3 para obter os resultados qualitativos.

Tabela 18. Medidas de extensão (cm) dos halos.

Formulação	L929		Hela	
	Medida do halo (cm)	Citotoxicidade	Medida do halo (cm)	Citotoxicidade
Controle -	0,00	Ausência	0,00	Ausência
Controle +	1,51	Severa	1,78	Severa
FW	0,46	Branda	0,28	Branda
FPC	0,51	Moderada	0,63	Moderada
FWC	0,49	Branda	0,58	Moderada
FPCC	0,37	Branda	0,92	Moderada

Os controles negativos (meio de cultura) não apresentaram formação de halo e foram classificados como tendo 0 grau de citotoxicidade (ausência); controles positivos (Triton-X) apresentaram formação de halo superior a 1,0 cm, representando uma citotoxicidade severa. Os controles não sofreram nenhuma alteração na confluência celular até o final do experimento, confirmando a validade do teste.

Para o ensaio usando a célula L929 as formulações FW, FWC e FPCC apresentaram citotoxicidade branda (até 0,5 cm) e a formulação FPC apresentou citotoxicidade moderada (0,5 – 1cm) de acordo com a Tabela 3, que representa os graus de citotoxicidade.

Os níveis de citotoxicidade foram determinados pela capacidade da formulação em induzir danos celulares; quanto maior a citotoxicidade, menor a capacidade da formulação de exercer sua função sem gerar uma resposta indesejada no hospedeiro. Esses testes são essenciais para garantir que o corpo possa tolerar as formulações em estudo.

Foi possível observar que todas as formulações apresentaram uma baixa citotoxicidade para a célula saudável. Além disso, a formulação FPCC apresentou o menor nível de toxicidade entre as formulações, possivelmente pela presença dos polímeros e da curcumina. A quitosana pode induzir a proliferação de fibroblastos o que indica que além dela não ser tóxica para as células saudáveis ela contribui para a reparação tecidual (HOWLING et al., 2002).

Rodero e colaboradores (2018) incorporaram curcumina em um sistema precursor de cristal líquido composto por diferentes porcentagens de ácido oleico, ergosterol, álcool cetílico etoxilado 20 e propoxilado 5 e quitosana para o tratamento de candidíase vulvovaginal. Eles testaram a citotoxicidade das formulações em células de fibroblasto L929 pelo método de difusão em ágar e verificaram que todas as formulações apresentaram citotoxicidade moderada.

Para o ensaio usando células Hela a formulação FW apresentou citotoxicidade branda (até 0,5 cm) e as formulações FPC, FWC e FPCC apresentaram citotoxicidade moderada (0,5 – 1cm) de acordo com a Tabela 3 que representa os graus de citotoxicidade.

Foi possível observar que as formulações, FWC, FPC e FPCC apresentaram uma citotoxicidade moderada para as células de câncer cervical Hela. Além disso, a formulação contendo os polímeros e a curcumina (FPCC) apresentou o maior nível de toxicidade entre as formulações possivelmente pela presença dos polímeros e da curcumina. Os polímeros apresentam carga positiva o que promove adesão celular, permitindo que a formulação tenha um maior contato com as células. Além disso, a quitosana apresenta um efeito anticâncer direto, como a indução de apoptose de células tumorais (KIM, 2018)

A curcumina também apresenta um efeito tóxico para as células Hela uma vez que ela é capaz de causar apoptose nessa linhagem de célula. Kayacan et al., 2018 sugeriram que a curcumina é eficaz na apoptose e na morte celular relacionada à autofagia em células HeLa. Ahmadi et al., 2017 desenvolveu nanopartículas (NPs) de quitosana-alginato-tripolifosfato de sódio carregadas com curcumina e sugeriram que as NPs carregadas com curcumina suprimiram significativamente a proliferação e promoveram a indução de apoptose em células Hela, podendo ser considerado uma estratégia alternativa eficaz para a terapia do câncer.

4.6. Ensaio in vivo utilizando o modelo de membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM)

4.6.1. Ensaio para avaliação das alterações vasculares da CAM

Primeiramente, diferentes quantidades de formulações foram aplicadas sobre a CAM 100 µL, 50 µL e 20 µL, porém, após 24 horas, todos os embriões morreram, indicando que as formulações foram tóxicas.

Formulações tópicas contendo tensoativos podem causar algumas reações adversas como irritação da pele ou da mucosa, podendo também causar lesões decorrentes de processos histoquímicos e biológicos, revelando que tensoativos podem ser tóxicos (SILVA et al, 2014). Portanto, apesar do nosso grupo de pesquisa ter demonstrado após análises histológicas da derme de ratos que sistemas líquidos cristalinos compostos por 40% de Procetyl[®] AWS e ácido oleico são biocompatíveis e apresentam baixa toxicidade (CARVALHO et al. 2012; SILVA et al, 2014; OYAFUSO et al., 2015), sugere-se que o componente que causou a morte dos embriões foi o tensoativo Procetyl[®] AWS. Calixto e colaboradores (2017) aplicaram 40 uL isoladamente do Procetyl[®] AWS, ácido oleico e dispersão bipolimérica de quitosana + polietilenoimina sobre a CAM e observaram que o tensoativo provocou uma grande alteração vascular na CAM, indicando ser tóxico, enquanto os outros componentes não apresentaram alterações vasculares significativas.

Portanto, foi realizada uma diluição em soro fisiológico de 10 vezes dos sistemas, a fim de diminuir a concentração do Procetyl[®] AWS nas formulações. Os ovos foram analisados antes da administração (antes), no momento logo após a administração (0 horas) e após 4 horas e 24 horas após a administração tópica das formulações. As análises foram realizadas em quadruplicata. A Figura 25 mostra os vasos sanguíneos antes da administração, logo após a administração e após 4 horas de administração. Após 24 horas, todos os embriões morreram.

Foi possível observar que no grupo controle até a após 24 horas da aplicação do soro fisiológico não houve nenhuma alteração vascular significativa. O mesmo pode ser observado no momento 0 horas para as formulações FW, FPC, FWC e FPCC onde não foi observado alterações vasculares significativas. No intervalo após 4 horas, para todas as formulações foi possível observar que houve alterações vasculares, alguns vasos de pequeno calibre desapareceram e outros tiveram uma diminuição do calibre. Isso mostra que as formulações apresentaram um efeito antiangiogênico, porém, mesmo com a diluição, as formulações foram tóxicas após 24 horas, onde causaram o colapso da maioria dos vasos sanguíneos levando a morte dos embriões.

Apesar das formulações terem sido tóxicas no experimento *in vivo* usando o modelo CAM, observou-se que as formulações com curcumina apresentaram uma alteração maior dos vasos como era esperado devido ao seu efeito antiangiogênico. Buzzá e colaboradores (2019) verificaram que a curcumina em concentrações variando de 0,1 a 10 mM / cm² apresentou efeitos vasculares no modelo CAM.

Além disso, as formulações contendo os polímeros apresentaram uma menor alteração dos vasos, provavelmente porque a QS apresenta atividade anti-inflamatória.

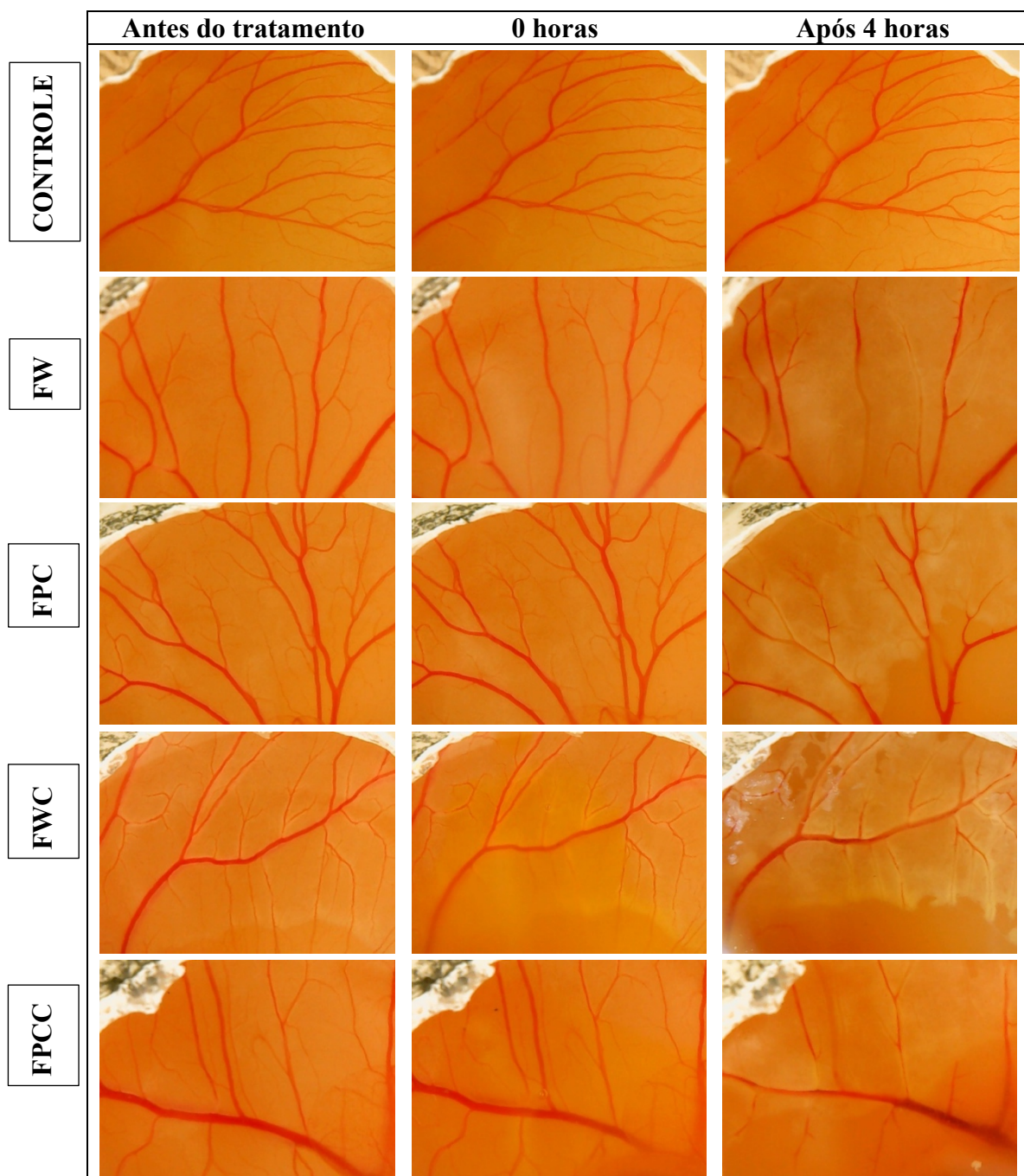


Figura 25. Análise visual das alterações vasculares causadas pelo controle e formulações FW, FPC, FWC e FPCC no modelo CAM.

A inflamação é a primeira resposta protetora à infecção ou lesão, conduzida em um compartimento de tecido por um conjunto específico de células imunes e inflamatórias, a fim de restaurar sua integridade estrutural e funcional após a exposição a um estímulo adverso (KIM, 2018; GALLO et al., 2017). Portanto, quando a formulação tóxica é aplicada sobre a

CAM, inicia-se um processo inflamatório, onde ocorre a vasodilatação dos vasos sanguíneos seguido da lise.

A QS contribui para que essa inflamação não ocorra, diminuindo a possibilidade de lise dos vasos. Diversas pesquisas foram realizadas sobre as propriedades anti-inflamatórias da QS. Oliveira et al. (2012) avaliaram a inibição de citocinas pró-inflamatórias e atividades anti-inflamatórias do filme de quitosana. Observou-se uma redução do TNF- α (citocinas pró-inflamatórias) em 3 a 10 dias de células cultivadas em filme de quitosana e aumento significativo das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β 1. Davydova e colaboradores (2016) testaram a atividade anti-inflamatória da quitosana com alto (massa molecular: 115 kDa) e baixo peso molecular (massa molecular: 5.2kDa), e ambas as amostras de quitosana apresentaram uma indução intensificada da citocina anti-inflamatória da IL-10 no sangue animal e supressão do progresso da colite. Além disso, os autores concluíram que a principal contribuição para a atividade anti-inflamatória da quitosana foi impulsionada por elementos estruturais que compõem sua molécula, mas não dependem da massa molecular. Friedman et al. 2013 demonstraram a capacidade de inibição de nanopartículas de quitosana-alginato contra citocinas e quimiocinas inflamatórias induzidas por *P. acnes*. Os resultados revelaram que as nanopartículas de quitosana-alginato inibiram a produção de citocinas induzidas por *P. acnes* em monócitos humanos e queratinócitos em doses dependentes.

Dessa forma, foi possível concluir que apesar dos SLCs terem apresentado citotoxicidade no modelo CAM devido a alta concentração de Procetyl[®] AWS, a presença da QS pode controlar o efeito da toxicidade devido a sua atividade anti-inflamatória, mostrando-se ser interessante sua utilização em conjunto com tratamentos que podem causar inflamação. Além disso, conclui-se que a curcumina liberada dos sistemas apresentou atividade angiogênica.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios citotóxicos *in vitro* e no modelo CAM *in vivo* foi possível compreender a importância do desenvolvimento de ensaios alternativos *in vivo* onde se possa mimetizar o microambiente *in vivo* humano de forma confiável.

5. CONCLUSÕES

Concluiu-se que foi possível desenvolver SLCs de fase lamelar misturando tensoativo (procetyl), fase oleosa (ácido oleico) e fase aquosa (com ou sem QS e PEI).

As formulações com e sem fármaco e muco vaginal artificial revelaram propriedades mecânicas, mucoadesivas e reológicas apropriadas para administração vaginal, assim como também foi verificado no ensaio mucoadesivo onde a adição dos polímeros nas formulações

aumentou os valores de força e de trabalho mucoadesivo. No geral a adição de muco vaginal artificial na concentração de 30% e 50% contribuiu para o aumento da força mucoadesiva.

Nos ensaios de liberação, permeação e retenção *in vitro* verificou-se que o perfil de liberação da CUR foi controlado pelos SLCs e que as formulações FPC e FW retiveram uma quantidade semelhante de CUR.

No ensaio de citotoxicidade verificou-se que as formulações foram biocompatíveis com as células de fibroblastos L929 e tóxica para as células Hela, mostrando-se ser compatível para o tratamento do câncer cervical.

No modelo CAM verificou-se que apesar das formulações terem sido tóxicas após 24 horas, as formulações conseguiram diminuir o calibre e o número de vasos após 4 horas.

De maneira geral os sistemas desenvolvidos demonstraram ser uma abordagem interessante e inovadora para o tratamento de câncer cervical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-HAMID, N.M.; ABASS, S.A.; MOHAMED, A.A.; HAMID, D.M. Herbal management of hepatocellular carcinoma through cutting the pathways of the common risk factors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 107, p. 1246-1258, 2018.
2. ALEXANDROV, L.B., et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**. v. 500, p. 415-421, 2013.
3. AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. **Anticancer Research**. v. 23, n. 1A, p. 363-398, 2003.
4. AGNIHOTRI A.S; MALLIKARJUNA N.N.; AMINABHAVI T.M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**. v. 100, p. 5–28, 2004.
5. AHMAD, M.Z. et al. Progress in nanotechnology-based drug carrier in designing of curcumin nanomedicines for cancer therapy: current state-of-the-art. **Journal of Drug Targeting**. v. 24, n. 4, p. 273-293, 2015.
6. AHMADI, F. Induction of apoptosis in hela cancer cells by an ultrasonic-mediated synthesis of curcumin-loaded chitosan–alginate–sTPP nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**. v. 12, p. 8545–8556, 2017.
7. AIDÉ, S. et al. Neoplasia intraepitelial cervical. **DST Jornal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 21, n. 4, p. 166-170, 2009.

8. ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A.B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.B.; THARAKAN, S.T.; LAI, O.S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B.B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical research**. v. 25, p. 2097-2116, 2008.
9. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALEN Jr, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2000.
10. ASSMANN, G., et al. International consensus statement on olive oil and the Mediterranean diet: implications for health in Europe. The Olive Oil and the Mediterranean Diet Panel. **European Journal Cancer Prevention**, v. 6, p. 418-421, 1997.
11. AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
12. AUSPRUNK, D.H.; KNIGHTON, D.R.; FOLKMAN, J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. **Developmental biology**. v. 38, p. 237-248, 1974.
13. AUSTIN L.T.; AHMAD F.; MCNALLY M. J.; STEWART, D. E. Breast and cervical cancer screening in Hispanic women: a literature review using the health belief model. **Women Health Issues**, v. 12, n. 3, p. 122-128, 2002.
14. AMERICAN CANCER SOCIETY. Cervical Cancer. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer.html>. Acesso em: 05 Janeiro 2020.
15. AMERICAN CANCER SOCIETY. Cervical Cancer Stages. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>. Acesso em: 05 Janeiro 2020.
16. BAGHDAN, E., et al. Lipid coated chitosan-DNA nanoparticles for enhanced gene delivery. **International Journal Pharmaceutics**. v. 535, p. 473-479, 2018.
17. BALUK, P.; HASHIZUME, H.; MCDONALD, D.M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 15, n. 1, p. 102-111, 2005.
18. BASIT, A.W. Advances in colonic drug delivery. **Drugs**. v. 65, p. 1991-2007, 2005.
19. BENJAMINSEN, R.V. et al. The possible “proton sponge” effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. **Molecular Therapy**. v. 21, n. 1, p. 149-157, 2013.

20. BERGSTRÖM, A., et al. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. **International journal of Cancer**. v. 91, p. 421-430, 2001.
21. BERNEGOSS, J. et al. Green tea glycolic extract-loaded liquid crystal systems: development, characterization and microbiological control. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 383-390, 2016.
22. BERNKOP-SCHNURCH A.; DUNNHaupt, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceuticcs**. v. 81, p. 463–469, 2012.
23. BERSAMIN, A., et al. Westernizing diets influence fat intake, red blood cell fatty acid composition, and health in remote Alaskan Native communities in the center for Alaska Native health study. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 108, p. 266-273, 2008.
24. BESLER, H.T.; GRIMBLE, R.F. Comparison of the modulatory influence of maize and olive oils and butter on metabolic responses to endotoxin in rats. **Clinical science (London)**. v. 88, p. 59-66, 1995.
25. BOSCH, F. X., et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 4, p. 244 – 265, 2002.
26. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017.
27. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE nº 899**, “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. 2003.
28. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2016.
29. BRAY, F.; et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**. v. 68, p. 394-424, 2018.
30. BREMER, C. et al. In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition. **Nature medicine**. v. 7, n. 6, p. 743-748, 2001.
31. BRUNO, B. J.; MILLER, G. D.; LIM, C. S. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. **Therapeutic delivery**. v.4, p. 1443-1467, 2013.
32. BRUSCHI, M. L. et al. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: development and

- characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 34, n. 3, p. 267-278, 2008.
33. BUZZÁ, H.H., et al. Vascular Effects of Photodynamic Therapy with Curcumin in a Chorioallantoic Membrane Model. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 20, p. 1084, 2019.
 34. CALIXTO, G. et al. Polyacrylic acid polymers hydrogels intended to topical drug delivery: preparation and characterization. **Pharmaceutical Development and Technology**. v. 20, n. 4, p. 490-496, 2015.
 35. CALIXTO, G., et al. Design and Characterization of a Novel p1025 Peptide-Loaded Liquid Crystalline System for the Treatment of Dental Caries. **Molecules**. v. 21, n. 2, p. 158, 2016.
 36. CALIXTO, G.; VICTORELLI, F.; DOVIGO, L.; CHORILLI, M. Polyethyleneimine and Chitosan Polymer-Based Mucoadhesive Liquid Crystalline Systems Intended for Buccal Drug Delivery. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**. v. 19, n. 2, p. 820-836, 2018.
 37. CALIXTO, G. Sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal de peptídeo antigelatinolítico associados à terapia fotodinâmica no tratamento do câncer bucal. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2017.
 38. CARMELIET P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. **Oncology**. v. 69, p. 4-10, 2005.
 39. CARVALHO, F.C., et al. Rheological, mechanical and adhesive properties of surfactant- containing systems designed as a potential platform for topical drug delivery. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 8, n. 2, 2012.
 40. CARVALHO F.C., et al Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 62, n. 4, p. 430-439, 2010.
 41. CHAINANI-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of turmeric (*Curcuma longa*). **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 9, n. 1, p. 1618, 2003.

42. CHATTOPADHYAY, I.; BISWAS, K.; BANDYOPADHYAY, U.; BANERJEE, R. K. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. **Current science**. v. 87, n. 1, p. 44-53, 2004.
43. CHO, B. et al. Mesophase structure-mechanical and ionic transport correlations in extended amphiphilic dendrons. **Science**. v. 305, n. 5690, p. 1598-1601, 2004.
44. CHORILLI, M., et al. Rheological characterization and safety evaluation of non-ionic lamellar liquid crystalline systems containing retinyl palmitate. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 12, n. 2, p. 394-403, 2016.
45. CHORILLI, M., et al. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 85, n. 2, p. 182–188, 2011.
46. CINTRA, G.A.S., et al. Bioadhesive surfactant systems for methotrexate skin delivery. **Molecules**. v. 21, n. 2, p. 231, 2016.
47. CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**. v. 22, n. 3, p. 261–268, 2001.
48. CHEN, J., et al. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. **European Journal of Pharmacology**. v. 772, p. 33-42, 2016.
49. COLONE, M., et al. Redox-active Microcapsules as Drug Delivery System in Breast Cancer Cells and Spheroids. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**. v.10, p. 1-6, 2016.
50. COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal Pharmaceutical Sciences**. v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.
51. CRODA. SAFETY DATA SHEET PROCETYL™ AWS-LQ-(RB), 2010.
52. DA-LOZZO, E.J., et al. Curcumin/xanthan–galactomannan hydrogels: Rheological analysis and biocompatibility. **Carbohydrate Polymers**. v. 93, p. 279-284, 2013.
53. DANAEI, G., et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **The Lancet**. v. 366, p. 1784-1793, 2005.
54. DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**. v. 148, n. 2, p. 135-146, 2010.

55. DASHA, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan—a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**. v. 36, p. 981–1014, 2011.
56. DAS NEVES, J.; AMARAL, M. H.; BAHIA, M. F. Vaginal drug delivery. **Pharmaceutical Sciences Encyclopedia**, 2008.
57. DAVYDOVA, V. N., et al. Cytokine-inducing and anti-inflammatory activity of chitosan and its low- molecular derivative. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 52, n. 5, p. 476–482, 2016.
58. DERYUGINA, E.I., QUIGLEY, J.P. Chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules. **Methods in enzymology**. v. 444, p. 21-41, 2008.
59. DIVYA, C. S.; PILLAI, M. R. Antitumor Action of Curcumin in Human Papillomavirus Associated Cells Involves Downregulation of Viral Oncogenes, Prevention of NFkB and AP-1 Translocation, and Modulation of Apoptosis. **Molecular Carcinogenesis**. v. 45, n. 5, p. 320–332, 2006.
60. DROSOS, A.A.; MOUTSOPOULOS, H.M. Rheumatoid arthritis in Greece: clinical, serological and genetic considerations. **Clinical and experimental rheumatology**. v. 13, p. 7-12, 1995.
61. DUMORTIER, G. et al. Rheological study of a thermoreversible morphine gel. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 17, p. 1255-1265, 1991.
62. DUVOIX, A. et al. Chemopreventive and Therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**. v. 223, n. 2, p. 181-190, 2005.
63. EL-HAMMADI, M. M.; ARIAS, J. L. Nanotechnology for Vaginal Drug Delivery and Targeting. In: *Nanotechnology and Drug Delivery, Volume Two: Nano-Engineering Strategies and Nanomedicines against Severe Diseases*. CRC Press, 2016.
64. EGEBLAD, M. et al. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**. v. 2, n. 3, p. 161-174, 2002.
65. EXPONENT LITE Software: introduction to texture analysis. Version 4,5 [SI]: TAxT Plus, Stable Micro Systems, 2009, 1 CD-ROM.
66. EZZATI, M.; LOPEZ, A.D.; RODGERS, A.A.; Murray, C.J. Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. World Health Organization. Geneva. 2004.

67. FACHINETTI, N. et al. Comparative Study of Glyceryl Behenate or Polyoxyethylene 40 Stearate-Based Lipid Carriers for Trans-Resveratrol Delivery: Development, Characterization and Evaluation of the In Vitro Tyrosinase Inhibition. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTec*. 2018.
68. FANG, J.-Y.; HUNG, C.-F.; HUA, S.-C.; HWANG, T.-L. Acoustically active perfluorocarbon nanoemulsions as drug delivery carriers for camptothecin: drug release and cytotoxicity against cancer cells. *Ultrasonics*. v. 49, p. 39-46, 2009.
69. FAROOQUI et al. Curcumin for Neurological and Psychiatric Disorders. Chapter 2 - Curcumin: Historical Background, Chemistry, Pharmacological Action, and Potential Therapeutic Value. 2019.
70. FDA Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods, 1994.
71. FEDERMAN, J.L.; BROWN, G.C.; FELBERG, N.T.; FELTON, S.M. Experimental ocular angiogenesis. *American journal of ophthalmology*. v. 89, p. 231-237, 1980.
72. FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.
73. FERRARA, N.; HILLAN, K.J.; GERBER, H.-P.; NOVOTNY, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery*. v. 3, n. 5, 391-400, 2004.
74. FERREIRA, L.M.B., et al. Exploiting supramolecular interactions to produce bevacizumab-loaded nanoparticles for potential mucosal delivery. *European Polymer Journal*. v. 103, p. 238-250, 2018.
75. FERREIRA, N.N., et al. Alginate hydrogel improves anti-angiogenic bevacizumab activity in cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 119, p. 271-282, 2017a.
76. FERREIRA, N. N., et al. A Novel pH-responsive Hydrogel Based on Calcium Alginate Engineered by the Previous Formation of Polyelectrolyte Complexes (PECs) Intended to Vaginal Administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 43; n. 10, 1-33, 2017b.
77. FESTING, S.; WILKINSON, R. The ethics of animal research. *EMBO reports*. v. 8, p. 526-530, 2007.
78. FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New england journal of medicine*. v. 285, p. 1182-1186, 1971.

79. FONSECA – SANTOS, B.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals in in vitro performance tests. **Arabian Journal of Chemistry**. v.10, n. 7, p. 1029-1037, 2017.
80. FONSECA - SANTOS, B., et al. Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**. v. 2016, n. 11, p. 4553-4562, 2016.
81. FONSECA – SANTOS, B. et al. Trans-resveratrol-loaded nonionic lamellar liquid-crystalline systems: structural, rheological, mechanical, textural, and bioadhesive characterization and evaluation of in vivo anti-inflammatory activity. **International Journal of Nanomedicine**. v. 12, p. 6883–6893, 2017.
82. FORMARIZ, T. P. et al. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 63, n. 2, p. 287-295, 2008.
83. FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 3, p. 301 – 313, 2005.
84. FRANCO, E. L.; DUARTE – FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **Canadian Medical Association Journal**. v. 164, n. 7, p. 1017-25, 2001.
85. FRANK, S.A. Inheritance of cancer. **Discovery medicine**. v. 4, p. 396-400, 2009.
86. FRANK, L. A., et al. Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**. v. 9, p. 3151-3161, 2014.
87. FREITAS, L. M.; SOARES, C. P.; FONTANA, C. R.; Synergistic effect of photodynamic therapy and cisplatin: a novel approach for cervical cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 140, p. 365-373, 2014.
88. FRIEDMAN, A. J.; PHAN, J.; SCHAIRER, D. O. et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens,” **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 133, n. 5, p. 1231–1239, 2013.

89. FRUMOVITZ, M. et al. Quality of Life and Sexual Functioning in Cervical Cancer Survivors. **Journal Of Clinical Oncology**. v. 23, n. 30, p. 7428 - 7436, 2005.
90. GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant sustems across rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 212, p. 73-80, 2001.
91. GALLO, J.; RASKA, M.; KRIEGOVA, E.; GOODMAN, S. B. Inflammation and its resolution and the musculoskeletal system. **Journal of Orthopaedic Translation**. v. 10, p. 52–67, 2017.
92. GHALANDARLAKI, N.; ALIZADEH, A. M.; ASHKANI-ESFAHANI, S. Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. **BioMed Research International**. v. 2014, 23 pages, 2014.
93. GOSENCA, M.; BESTER-ROGAC, M.; GASPERLIN, M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 50, n. 1, p. 114–122, 2013.
94. GRATIERI, T. et al. 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.
95. GREIMEL, E. R. et al. Quality of life and sexual functioning after cervical cancer treatment: a long-term follow-up study. **Psycho-Oncology**. v. 18, p. 476 – 482, 2009.
96. GREISH, K. Enhanced permeability and retention effect for selective targeting of anticancer nanomedicine:^[1]_[SEP]are we there yet? **Drug Discovery Today: Technologies**. v. 9, n. 2, p. 161-166, 2012.
97. GÜNTHER, M. et al. Polyethylenimines for RNAi-mediates gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 77, n. 3, p. 438-449, 2011.
98. GUO, C., et al. Liotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discovery Today**. v. 15, n. 23, p. 1032-1040, 2010.
99. GUPTA, P.K.; HUNG, C.-T. Targeted delivery of low dose doxorubicin hydrochloride administered via magnetic albumin microspheres in rats. **Journal of microencapsulation**. v. 7, p. 85-94, 1990.

100. GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug discovery today**. v. 7, p. 569-579, 2002.
101. GUNSTONE, F. D. High resolution ^{13}C NMR. A technique for the study of lipid structure and composition. **Progress in Lipid Research**. v. 33, p. 19-28, 1994.
102. HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, p. 57-70, 2000.
103. HOLCOMB, K. M. D.; RUNOWICZ, C. D. Cervical Cancer Screening. **Surgical Oncology clinics of North America**. v. 14, p. 777-797, 2005.
104. HOLMQVIST, P.; ALEXANDRIDIS, P.; LINDMAN, B. Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer–Water–“Oil” Systems by Varying the “Oil” Type. **Macromolecules**. v. 30, n. 22, p. 6788-6796, 1997.
105. HORNSTRA G. Dietary fats, prostanoids and arterial thrombosis. **Biochemical physiology of dietary fats**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, p. 15–29, 1982.
106. HOWLING, G. I. et al. The effect of chitin and chitosan on fibroblast-populated collagen lattice contraction. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 36, p. 247-253, 2002.
107. HUANG, D., et al. Anti-angiogenesis or pro-angiogenesis for cancer treatment: focus on drug distribution. **International journal of clinical and experimental medicine**. v. 8, n. 6, p. 8369-8376, 2015.
108. HUANG, I.-P., et al. Enhanced chemotherapy of cancer using pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles to antagonize P-glycoprotein-mediated drug resistance. **Molecular cancer therapeutics**. v. 10, n. 761-769, 2011.
109. HUSSAIN, A.; AHSAN, F. The vagina as a route for systemic drug delivery. **Journal of Controlled Release**. v. 103, p. 301–313, 2005.
110. HUSSAIN, S.P., HOFSETH, L.J., HARRIS, C.C. Radical causes of cancer. **Nature Reviews Cancer**. v. 3, n.4, 276 - 285, 2003.
111. HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K., ed. Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap.16, p.299-332.
112. IBRAHEEM, D., ELAISSARI, A., FESSI, H. Gene therapy and DNA delivery systems. **International journal of pharmaceutics**. v. 459, p. 70-83, 2014.

113. ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, 2005.
114. ILLUM, L., et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 51, p. 81–96, 2001.
115. INCA Instituto Nacional de Câncer. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>Acesso em: 01 Janeiro 2020.
116. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.
117. IQBAL, M., et al. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. **Journal of Pharmacology and Toxicology**. v. 92, n. 1, p. 33-38, 2003.
118. ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.
119. JAIN, R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. **Science**. v. 307, n. 5706, p. 58-62, 2005.
120. JAIN, A., et al. Peptide and protein delivery using new drug delivery systems. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 30, p. 293-329, 2013.
121. JAGTAP, S. et al. Chemoprotective Mechanism of the Natural Compounds, Epigallocatechin-3-O-Gallate, Quercetin and Curcumin Against Cancer and Cardiovascular Diseases. **Current Medicinal Chemistry**. v. 16, n. 12, p. 1451-1462, 2009.
122. JAYANTHI, S.A.; DAS, A.B.; SAXENA, U. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 91, p. 15-23, 2017.
123. JERE, D. et al. Chitosan-graft-polyethylenimine for Akt1 siRNA delivery to lung cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 378, n. 1-2, 194-200, 2009.
124. JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolid: Mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 61, n. 12, p. 2229–2234, 1996.

125. JOSSA, F.; MANCINI, M. The Mediterranean diet in the prevention of arteriosclerosis. **Recenti progressi in medicina**. v., 87, p. 175-181, 1996.
126. JOSEFSON, D. Obesity and inactivity fuel global cancer epidemic. **British Medical Journal**. v., 322, n. 7292, p. 945, 2001.
127. KANG, M.L.; CHO, C. S.; YOO, H. S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnology Advances**. v. 27, n. 6, p. 857–865, 2009.
128. KARAVANA, S. Y.; GÜNERI, P.; ERTAN, G. Benzydamine hydrochloride buccal bioadhesive gels designed for oral ulcers: Preparation, rheological, textural, mucoadhesive and release properties. **Pharmaceutical Development and Technology**. v. 14, n. 6, p. 623-631, 2009.
129. KAST, C. E., et al. A. Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole. **Journal of controlled release**. v. 81, n. 3, p. 347– 354, 2002.
130. KAYACAN, S. et al. The Effects of Apigenin and Curcumin on Autophagy Related Cell Death and Apoptosis. **Proceedings**. v. 2, n. 25, p. 1586, 2018.
131. KESSENBROCK, K. et al. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. **Matrix biology**. v. 44, n. 184-190, 2015.
132. KHATRI, S., LOHANI, P., GANDHI, S. Nanoemulsions in cancer therapy. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 3, p. 124-133, 2013.
133. KIM, S. Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities. **International Journal of Polymer Science**. v. 2018, 13p, 2018.
134. KLUG, H. P.; ALEXANDER, L. E. X-ray Diffraction Procedures for polycrystalline and amorphous materials, John Wiley & Sons, New York, 1954.
135. KOBAYASHI, H.; WATANABE, R.; CHOYKE, P. L. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; Whats Is the Appropriate Target? **Theranostics**. v. 4, n. 1, p. 81-89, 2014.
136. KOIDE S.S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**. v. 18, p. 1091–101, 1998.
137. KOIVUNEN, E. et al. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. **Nature biotechnology**. v. 17, n. 8, p. 768-774, 1999.

138. KONO, K., et al. Highly temperature-sensitive liposomes based on a thermosensitive block copolymer for tumor-specific chemotherapy. **Biomaterials**. v. 31, p. 7096-7105, 2010.
139. KREMER, J.M., et al. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. **Arthritis & Rheumatology**. v. 33, p. 810-820, 1990.
140. KUMAR MNVR. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. v. 46, p. 1–27, 2000.
141. KUMAR, M. N. V. R., et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**. v. 104, n. 12, p. 6017–6084, 2004.
142. KUNNUMAKKARA, A. B.; ANAND, P.; AGGARWAL, B. B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. **Cancer Letters**. v. 269, n. 2, p. 199-225, 2008.
143. LAHOUD, M. H.; CAMPOS, R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. **Visão Acadêmica**. v. 11, n. 1, p. 65-73, 2010.
144. LARDINOIS, C.K. The role of omega 3 fatty acids on insulin secretion and insulin sensitivity. **Medical Hypotheses**. v. 24, p. 243-248, 1987.
145. LAO, C. D., et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 6, n. 10, 2006.
146. LEE, A. Y. L., et al. Curcumin Inhibits Invasiveness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma Through Reducing Matrix Metalloproteinase 2, 9 and Modulating p53-E-Cadherin Pathway. **Integrative Cancer Therapies**. v. 14, n. 5, p. 484–490, 2015.
147. LECHUGA-BALLESTEROS, D.; ABDUL-FATTAH, A.; STEVENSON, C.L., BENNETT, D.B. Properties and stability of a liquid crystal form of cyclosporine—the first reported naturally occurring peptide that exists as a thermotropic liquid crystal. **Journal of pharmaceutical sciences**. v. 92, p. 1821-1831, 2003.
148. LEIGHTON, J.; NASSAUER, J.; TCHAO, R. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. **Food and chemical toxicology**. v. 23, p. 293-298, 1985.
149. LI, C.Y. et al. Sulfonate-modified phenylboronic acid-rich nanoparticles as a novel mucoadhesive drug delivery system for vaginal administration of protein therapeutics:

- improved stability, mucin-dependent release and effective intravaginal placement. **International Journal of Nanomedicine**. v. 11, p. 5917 - 5930, 2016.
150. LI, C.-Y., et al. Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 92, p. 143-147, 2000.
 151. LI, Y., et al. Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery. **Chemical reviews**. v. 115, p. 8564-8608, 2015.
 152. LINOS, A., et al. The effect of olive oil and fish consumption on rheumatoid arthritis- a case control study. **Scandinavian Journal of Rheumatology**. v. 20, p. 419-426, 1991.
 153. LIPWORTH, L., et al. Olive oil and human cancer: an assessment of the evidence. **Preventive Medicine**. v. 26, p. 181-190, 1997.
 154. LIU, J.; BU, W.; PAN, L.; SHI, J. NIR-triggered anticancer drug delivery by upconverting nanoparticles with integrated azobenzene-modified mesoporous silica. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 52, p. 4375-4379, 2013.
 155. LOCK, K.; POMERLEAU, J.; CAUSER, L.; MCKEE, M. Low fruit and vegetable consumption, Comparative Quantification of Health Risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. **World Health Organization**. v. 83, n.2, p. 597-728, 2004.
 156. LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.
 157. MACHADO, J. C. Fundamentos e Classificação de Fluidos Viscosos. Reologia e Escoamento de Fluidos– Ênfase na indústria do petróleo. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2002.
 158. MAIOR, J. F. A. S.; REIS, A.V.; MUNIZ, E.C.; CAVALCANTI, O.A. Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. **International journal of pharmaceutics**. v. 355, p. 184-194, 2008.
 159. MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A.M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in pharmacological sciences**. v. 30, p. 592-599, 2009.
 160. MALMSTEN, M. Surfactants and Polymers in Drug Delivery. **Journal of the American Chemical Society**. v. 125, n. 11, p. 3400, 2003

161. MANAIA, E. B. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO₂ para proteção solar e liberação controlada de terpinem-4-ol. 2012. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.
162. MARTIN-MORENO, J.M., et al. Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. **International Journal of Cancer**. v. 58, p. 774-780, 1994.
163. MARTINEZ- GUERRA, J. et al. New insights on the Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Media at Different pH: Influence of the Experimental Conditions. **International Journal of Electrochemical Science**. v. 14, p. 5373 – 5385, 2019.
164. MATSUMURA, Y.; KATAOKA, K. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. **Cancer science**. v. 100, p. 572-579, 2009.
165. MAZZARINO, L.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e Caracterização Farmacotécnica de Formas Farmacêuticas Semi- Sólidas Contendo Nimesulida. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 26, n. 3, p. 415-419, 2007.
166. MERINO-BOHÓRQUEZ, V. et al. Physicochemical stability of a new topical timolol 0.5% gel formulation for the treatment of infant hemangioma. **Pharmaceutical development and technology**. v. 20, n. 5, p. 562-569, 2015.
167. MEZZENGA, R. et al, Nature-Inspired Design and Application of Lipidic Lyotropic Liquid Crystals. **Advanced Materials**. v. 31, n. 35, p. 1-19, 2019.
168. MILES, E.A.; CALDER, P.C. Modulation of immune function by dietary fatty acids. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 57, p. 277-292, 1998.
169. MUELLER-GOYMANN, C. C.; FRANK, S. G.; Interaction of lidocaine and lidocaine- HCl with the liquid crystal structure of topical preparations. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 29, n. 2, p. 147-159, 1986.
170. MULROONEY, H.M.; GRIMBLE, R.F. Influence of butter and of corn, coconut and fish oils on the effects of recombinant human tumour necrosis factor-alpha in rats. **Clinical science (London)**. v. 84, p. 105-112, 1993.
171. MULVAD, G., et al. The Inuit diet. Fatty acids and antioxidants, their role in ischemic heart disease, and exposure to organochlorines and heavy metals. An international study. **Arctic medical research**. v. 55, p. 20-24, 1996.

172. MUÑOZ, N. et al. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The new england journal of medicine**. v. 348, n. 6, p. 518 – 527, 2003.
173. NAGY, J.A.; et al. Heterogeneity of the tumor vasculature. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. v. 36, n. 3, 321- 331, 2010.
174. NAGY, J.A.; DVORAK, A.M.; DVORAK, H.F. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**. v. 2, p. 251-275, 2007.
175. NASONGKLA, N., et al. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. **Nano letters**. v.6, p. 2427-2430, 2006.
176. NAVARRO, V. P. et al. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista Odontologia da UNESP**. v.35, n. 4, p. 233-38, 2006.
177. NEVES, J.; AMIJI, M.; SARMENTO, B. Mucoadhesive nanosystems for vaginal microbicide development: friend or foe? **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**. v.3, n. 4, p. 389-399, 2011.
178. NOBORU, L. Avaliação do potencial de nanodispersões de cristal líquido funcionalizadas com cetuximabe na veiculação de docetaxel para o tratamento do câncer de próstata. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2018.
179. NUKAMA Y. Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications. Chapter 15 – Surfactants. 231-244, 2017.
180. OLIVEIRA, M. B. et al. Development, characterization, and in vitro biological performance of fluconazole-loaded microemulsions for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **BioMed Research International**. v. 2015, 12 pages, 2015.
181. OLIVEIRA, M. I., et al. Chitosan drives anti-inflammatory macro- phage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation. **European Cells and Materials**. v. 24, p. 136–153, 2012.
182. OYAFUSO, M. H. et al. Design and Characterization of Silicone and Surfactant Based Systems for Topical Drug Delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 15, n. 1, p. 817-826, 2015.

183. PANAGIOTAKOS, D.B., et al. Mediterranean diet and inflammatory response in myocardial infarction survivors. **International Journal of Epidemiology**. v. 38, p. 856-866, 2009.
184. PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 309, n. 1-2, p. 44-50, 2006.
185. PARK, J.W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Research*. v. 4, n. 3, p. 95-99, 2002.
186. PEEK, M., NORMAN, T., MORGAN, C., MARKHAM, R., FRASER, I. The chick chorioallantoic membrane assay: an improved technique for the study of angiogenic activity. **Experimental pathology**. v. 34, p. 35-40, 1988.
187. PÉNZES, T.; CSOKA, I.; ERŐS, I. Rheological analysis of the structural properties effecting the percutaneous absorption and stability in pharmaceutical organogels. **Rheologica Acta**. v. 43, n. 5, p. 457-463, 2004.
188. PERIOLI, L. et al. Rheological and functional characterization of new antiinflammatory delivery systems designed for buccal administration. **International journal of pharmaceutics**. v. 356, n. 1-2, p. 19-28, 2008.
189. PETO, J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. **Nature**. v. 411, p. 390 - 395, 2001.
190. PETO, R., et al. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. **British Medical Journal**. v. 321, p. 323-329, 2000.
191. PEZZINI, B.R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, p. 491-502, 2007.
192. PINTO, I. C., et al. Development and validation of an analytical method using high performance liquid chromatography (HPLC) to determine ethyl butylacetylaminopropionate in topical repellent formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 53, n. 2, p. 1-8, 2017.
193. PRABAHARAN M. Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. **Journal of Biomaterials Applications**. v. 23, n. 1, p. 5-36, 2008.

194. PRICE, J., BARRY, M., ANDREWS, I. The use of the chick chorioallantoic membrane to predict eye irritants. **Food and Chemical Toxicology**. v. 24, p. 503-505, 1986.
195. RADAIC, A. et al. Studying the interactions between nanoparticles and biological systems. **Química Nova**. v. 39, n. 10, p. 1236-1244, 2016.
196. RAMOS, M.A.S. et al. Syngonanthus nitens Bong. (Rhul.)-loaded nanostructured system for vulvovaginal candidiasis treatment. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 17, n. 8, 2016.
197. RAMOS, M.A.S., et al. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland against infection by Candida krusei. **International Journal of Nanomedicine**. v. 10, p. 7455-7466, 2015.
198. RAPOPORT, N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. **Progress in Polymer Science**. v. 32, p. 962-990, 2007.
199. RAVAL, K.M. et al. Microbial biotransformation: Pharmaceutical peptides. **Journal of Biological and Food Science Research**. v. 1, n. 1, p. 1-14, 2012.
200. REHM, J., et al. Alcohol as a risk factor for global burden of disease. **European addiction research**. v. 9, p. 157-164, 2003.
201. RIBATTI, D., et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. **The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists**. v. 264, p. 317-324, 2001.
202. RICCI, M., et al. Ketoprofen controlled release from composite microcapsules for cell encapsulation: effect on post-transplant acute inflammation. **Journal of controlled release**. v. 107, p. 395-407, 2005.
203. RITGER, P.; PEPPAS, N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**. v. 5, n. 1, p. 37- 42, 1987.
204. RODERO, C., et al. Curcumin-Loaded Liquid Crystalline Systems for Controlled Drug Release and Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Molecular Pharmaceutics**. v. 15, n. 10, p. 4491–4504, 2018.
205. RODERO, C., et al. Sistemas líquido-cristalinos como potencial estratégia para administração vaginal de curcumina no tratamento da candidíase vulvovaginal.

- Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2017.
206. ROWE, R.C.; SHESKEY, P. J.; WELLER, P. J.; Handbook of Pharmaceutical Excipients. 4 ed. Washington, DC: American Pharmaceutical Association/Pharmaceutical Press, 2003.
 207. ROY, M.; MUKHERJEE, S. Reversal of Resistance towards Cisplatin by Curcumin in Cervical Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 15, n. 13, p. 1403 – 1410, 2014.
 208. SALES-CAMPOS H. et al. An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 201-210, 2013.
 209. SALMAZI, R. A, et al. Curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Nanomedicine**. v. 10, n. 1, p. 4815 - 4824, 2015.
 210. SAVIC, S., et al. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 358, n. 1, p. 182-191, 2011.
 211. 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.
 212. SCHIPPER, N. G., et al. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. **Pharmaceutical Research**. v. 14, p. 923–929, 1997.
 213. SCHRAMM, G. Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2006.
 214. ŞENYIGIT, T. et al. Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for topical use: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 403, n. 1–2, p. 123–129, 2011.
 215. SEYFRIED, T.N.; SHELTON, L.M. Cancer as a metabolic disease. **Nutrition & metabolism**. v. 7, n. 7, 2010.
 216. 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.

217. SHANHOLTZ, C. Acute life-threatening toxicity of cancer treatment. **Critical care clinics**. v. 17, p. 483-502, 2001.
218. SHARMA, R.A.; GESCHER, A.J.; STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**. v. 41, n. 13, p. 1955-1968, 2005.
219. SHEHZAD, A.; LEE, Y. S. Molecular Mechanisms of Curcumin Action: Signal Transduction. **BioFactors**. v. 39, n. 1, p. 27-36, 2013.
220. SHI, S.; CHEN, L.; HUANG, G. Antiangiogenic therapy improves the antitumor effect of adoptive cell immunotherapy by normalizing tumor vasculature. **Medical Oncology**. v. 30, n. 4, p. 698, 2013.
221. SIEGEL, R.L., MILLER, K.D. Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 69, n. 1, p. 7-34, 2019.
222. SILVA, P.B. et al. Nanotechnological strategies for vaginal administration of drugs - a review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 10, p. 2218-2243, 2014.
223. SIMONSEN, N.R., et al. Tissue stores of individual monounsaturated fatty acids and breast cancer: the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68, p. 134-141, 1998.
224. SINGH, M.; SINGH, N. Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 325, n. 1-2, p. 107-119, 2009.
225. SINHA, V.R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International journal of pharmaceutics**. v. 224, p. 19-38, 2001.
226. SINHA, V.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. **Journal of controlled release**. v. 90, p. 261-280, 2003.
227. SLAYMAKER, E.; WALKER, N.; ZABA, B.; COLLUMBIEN, M. Unsafe sex, Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. World Health Organization. Geneva, 2004.
228. SMART, J. D. et al. The retention of C-labelled poly(acrylic acids) on gastric and oesophageal mucosa: an in vitro study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 20, n. 6, p. 83-90, 2003.
229. SOLANAS, M., et al. Effects of a high olive oil diet on the clinical behavior and histopathological features of rat DMBA- induced mammary tumors compared with a high corn oil diet. **International Journal of Oncology**. v. 21, p. 745-753, 2002.

230. SONI, S. S., et al. 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.
231. SUN, M., et al. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. **Nanomedicine**. v. 7, n. 7, p. 1085–1100, 2012.
232. SZAKÁCS, G., et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature reviews Drug discovery**. v. 5, n. 3, p. 219 - 234, 2006.
233. TAGAMI, T., et al. Anti-angiogenic therapy via cationic liposome-mediated systemic siRNA delivery. **International journal of pharmaceutics**. v. 422, p. 280-289, 2012.
234. TAI, A.; BIANCHINI, R.; JACHOWICZ, J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 36, n. 4, p. 291-304, 2014.
235. TAKEUCHI, H., et al. 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.
236. TERES, S., et al. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 105, p. 13811-13816, 2008.
237. THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nature**. v. 543, p. 378- 384, 2017.
238. TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**. v. 180, n. 5, 402 – 404, 1985.
239. TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J.; VANHENEGOUWEN, G.B.. Studies on curcumin and curcuminoids. 8. Photochemical stability of curcumin. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**. v. 183, p. 116 - 122, 1986.
240. TØNNESEN, H.H., ed. Photostability of drugs and drug formulations. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. 435p.
241. TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 63, 3, 131-135, 2011.
242. TSIMIKAS, S.; REAVEN, P.D. The role of dietary fatty acids in lipoprotein oxidation and atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**. v. 9, p. 301-307, 1998.
243. USP 33. The United States Pharmacopoeia: The National Formulary; NF 28. Rockville United States Pharmacopeial Convention, 2010.

244. VALDES, T.; KREUTZER, D.; MOUSSY, F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 62, n. 2, p. 273-282, 2002.
245. VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57, n. 11, p. 1692- 1712, 2005.
246. VAN MEIR, H., et al. Impact of (chemo) radiotherapy on immune cell composition and function in cervical cancer patients. **Oncoimmunology**. v. 6, n. 2, 2017.
247. VARGAS, A., et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**. v. 59, p. 1162-1176, 2007.
248. VICTORELLI, F. D., et al. Metronidazole-Loaded Polyethyleneimine and Chitosan-Based Liquid Crystalline System for Treatment of Staphylococcal Skin Infections. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 14, n. 1, p. 227-237, 2018.
249. WANG, Z., et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. **Seminars in Cancer Biology**. v. 35, p. 224–243, 2015.
250. WANG, L.J., et al. Targeting Slit–Roundabout signaling inhibits tumor angiogenesis in chemical-induced squamous cell carcinogenesis. **Cancer Science**. v. 99, p. 510-517, 2008.
251. WANG, Y. J., et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 15, n. 12, p. 186776, 1997.
252. WANG, Z., et al. Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. **Drug resistance updates**. v. 13, p. 109-118, 2010b.
253. WHO World Health Organization.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>. Acesso em: 02 Janeiro 2020.
254. WONG, T.W.; DHANAWAT, M.; RATHBONE, M.J. Vaginal drug delivery: strategies and concerns in polymeric nanoparticle development. **Expert Opinion on Drug Delivery**. v. 11, n. 9, p. 1419-1434, 2014.
255. YARIV, D. et al. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 78, n. 2, p. 185–192, 2010.

256. YANG, X., et al. Tumor-Targeting, pH-Responsive, and Stable Unimolecular Micelles as Drug Nanocarriers for Targeted Cancer Therapy. **Bioconjugate Chemistry**. v. 21, n. 3, p. 496-504, 2010.
257. YANG, M., et al. Vaginal Delivery of Paclitaxel via Nanoparticles with Non-Mucoadhesive Surfaces Suppresses Cervical Tumor Growth. **Advanced Healthcare Materials**. v. 3, n. 7, p. 1044-1052, 2014.
258. YAQOOB, P. Monounsaturated fats and immune function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 31, p. 453-465, 1998.
259. YOUSEF, S. A. et al., Mechanistic Evaluation of Enhanced Curcumin Delivery through Human Skin In Vitro from Optimised Nanoemulsion Formulations Fabricated with Different Penetration Enhancers. **Pharmaceutics**. v.11, n. 12, 2019.
260. YUAN, Y.-J., et al. Application of the chick embryo chorioallantoic membrane in neurosurgery disease. **International journal of medical sciences**. v. 11, n. 12, p. 1275 - 1281, 2014.
261. ZEITLIN, B.D.; DONG, Z.; NÖR, J.E. RAIN-Droplet: a novel 3D in vitro angiogenesis model. **Laboratory investigation**. v. 92, 988-998, 2012.
262. ZICHE, M. Corneal assay for angiogenesis, Angiogenesis protocols. **Springer**. v. 46, p. 131-142, 2001.
263. ZONG, S. et al. The use of cisplatin-loaded mucoadhesive nanofibers for local chemotherapy of cervical cancers in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 93, p. 127-135, 2015.

CAPÍTULO 2

NANOPARTÍCULAS LÍQUIDO-CRISTALINAS COMO UM NOVO SISTEMA DE
ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS PARA A ADMINISTRAÇÃO DE
CURCUMINA: POTENCIAL APLICAÇÃO PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER
CERVICAL

RESUMO CAPÍTULO 2

O câncer do colo do útero é o tumor ginecológico que causa a maioria das mortes no mundo entre as mulheres, representando um grande problema de saúde pública. Existem vários fatores que contribuem para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, mas na maioria dos casos são causados por infecções persistentes pelo HPV. Os tratamentos convencionais, como cirurgia ginecológica, radioterapia e radioquimioterapia, são restritos e apresentam vários efeitos colaterais, impactando negativamente a qualidade de vida dos pacientes. Considerando esse cenário, é extremamente importante pesquisar novas moléculas bioativas para uso no tratamento antitumoral, como a curcumina (CUR), que provou ser uma alternativa inovadora e eficaz. No entanto, o uso terapêutico dessa molécula enfrenta muitos desafios, principalmente devido às suas características físico-químicas e baixa biodisponibilidade. Portanto, é necessário desenvolver sistemas de liberação de fármacos clinicamente adequados e seguros para permitir o uso desse composto, como sistemas líquidos cristalinos (SLCs) e nanopartículas líquidas cristalinas (NPLCs) que podem melhorar a permeação de fármacos e controlar sua liberação, além de diminuir a toxicidade sistêmica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver SLCs e NPLCs carregadas com curcumina e caracterizá-las usando análise de raios X de baixo ângulo (SAXS), tamanho de partícula e polidispersidade e microscopia eletrônica de transmissão criogênica (Cryo-TEM) além de realizar estudos de liberação, permeação e retenção *in vitro*. Os resultados do SAXS revelaram que a formulação CH apresentou fase hexagonal e as NPLCs apresentaram fase cúbica. Os resultados sugeriram que as NPLCs possuem escala nanométrica, uma vez que as partículas tinham diâmetro entre 166,67 a 182,71 nm e PDI na faixa de 0,126 a 0,278. O Cryo-TEM mostrou que houve a formação de cubossomos nas NPLCs. Os estudos de liberação, permeação e retenção *in vitro* mostraram que a formulação CH libera 1,82% e as NPLCs 42,04% e retém na mucosa vaginal 1,11% e 8,88%, respectivamente. Portanto, a partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os sistemas desenvolvidos demonstram ser uma abordagem interessante e inovadora para o tratamento do câncer de colo uterino.

Palavras-chave: cristal líquido, nanopartículas, cubossomos, curcumina, drug delivery, câncer.

ABSTRACT CHAPTER 2

Cervical cancer is the gynecological tumor that causes most deaths in the world among women, representing a major public health problem. There are a number of factors contributing to the development of cervical cancer but in most cases is caused by persistent HPV infections. Conventional treatments, such as gynecological surgery, radiotherapy and radiochemotherapy, are restricted and have several side effects, impacting negatively on patients' quality of life. Considering this scenario, it is extremely important to research new bioactive molecules for use in antitumor treatment, such as curcumin (CUR) which proved to be an innovative and effective alternative. However, the therapeutic use of this drug faces many challenges, mainly due to its physicochemical characteristics and low bioavailability. Therefore, it is necessary to develop clinically adequate and safe drug delivery systems to enable the use of this drug, such as lyotropic liquid crystal (LLCs) and liquid crystalline nanoparticles (LCNPs) that can improve the permeation of the drugs and control their release in addition to decreasing systemic toxicity. The objective of this work is to develop LLCs and LCNPs loaded curcumin and characterizing them using low angle X (SAXS), particle size and polydispersity analysis and Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) besides performing *in vitro* release, permeation and retention studies. The results of the SAXS revealed that the lyotropic liquid crystalline bulk CH showed hexagonal phase and the LCNPs showed cubic phase. The results suggested that the LCNPs has nanometer scale, since the particles had a diameter between 166.67 to 182.71 nm and PDI in the range of 0.126 to 0.278. The Cryo-TEM showed that there was the formation of cubosomes in LCNPs. The drug release, permeation and retention studies *in vitro* showed that the formulation CH release 1.82% and the LCNPs 42.04% and retained in vaginal mucosa 1.11% and 8.88%, respectively. Therefore, from the results obtained it can be concluded that the systems developed prove to be an interesting and innovative approach for the treatment of cervical cancer.

Key words: liquid crystalline, nanoparticles, cubosomes, curcumin, drug delivery, cancer.

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Introdução

Como visto no capítulo anterior o câncer do colo do útero é o terceiro câncer mais comum que afeta as mulheres (FREITAS et al., 2014), e é responsável por diversas mortes todos em todo o mundo a cada ano (WHO, 2019), representando um grande problema de saúde pública. Entre os diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, 95% dos casos são causados por infecções persistentes por papilomavírus humano (HPV) (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2017). O tratamento desse câncer pode ser realizado através de cirurgia, radioterapia ou radioquimioterapia, todos com impacto negativo na qualidade de vida das mulheres e, muitas vezes, com prognóstico desfavorável (GREIMEL et al., 2009, THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2017, INCA, 2017). Portanto, é necessário buscar tratamentos mais funcionais, inovadores e clinicamente viáveis.

Nesse contexto, a curcumina (CUR) mostra-se uma alternativa inovadora e eficaz. A CUR é capaz de proteger células saudáveis, devido em parte à sua alta capacidade antioxidante, enquanto induz apoptose em células cancerígenas (CHEN et al., 2016; DUVOIX et al., 2005; KUNNUMAKKARA et al., 2008). Além disso, este fármaco é um inibidor das metaloproteinases da matriz (MMPs) tipo 2 e 9 (LEE et al., 2015; KOIVUNEN et al., 1999), que estão relacionadas ao crescimento tumoral, podendo dessa forma controlar a proliferação, invasão e gênese de novos tumores (BREMER et al., 2001; EGEHLAD et al., 2002). A CUR é uma molécula altamente lipofílica que passa rapidamente através da membrana celular e não é tóxica para as células normais (GHALANDARLAKI et al., 2014), porém apresenta pouca solubilidade em água, baixa meia-vida e instabilidade química, o que diminui sua biodisponibilidade (GHALANDARLAKI et al., 2014, SUN et al., 2012, AHMAD et al., 2015). Dessa forma, sua incorporação em um sistema de administração de fármacos, como nanopartículas líquidas cristalinas (NPLCs), é uma estratégia farmacotécnica que pode viabilizar seu uso.

1.2. Nanopartículas líquidas cristalinas

No capítulo 1, abordou-se as características de um sistema líquido cristalino, assim como também a possibilidade do desenvolvimento das diferentes mesofases: lamelar, hexagonal e cúbica.

Quando cristais líquidos de fase cúbica e hexagonal são dispersos em um excesso de água com a adição de estabilizadores, como poloxamer (CHONG et al., 2011), eles formam dispersões coloidais estáveis, denominadas cubossomos e hexossomos, respectivamente (SPICER et al., 2005; YAGHMUR et al., 2009; LANCELOT et al., 2014; HIRLEKAR et al., 2010). Em geral, os métodos de preparação de cristais líquidos cúbicos e hexagonais são mais fáceis do que suas dispersões, uma vez que podem ser preparados misturando simplesmente as fases lipídica e aquosa (BOYD et al., 2006). Por outro lado, o desenvolvimento de cubossomos e hexossomos é mais complexo. Existem duas técnicas comumente usadas para preparar cubossomos ou hexossomos. O primeiro é chamado de “Top-Down”. Neste método, uma mistura do lipídeo capaz de formar a estrutura e estabilizadores são primeiro hidratados para permitir que eles se auto-estruturam formando um bulk. O bulk é então disperso em uma solução aquosa através da aplicação de energia de alto nível, como homogeneização a alta pressão, ultra-som e ultrassonicação, para cisalhar o precursor viscoso e formar cubossomos ou hexossomos (WORLE et al., 2007; GUSTAFSSON et al., 1997). A segunda técnica de preparação é chamada “Bottom-Up”. Nesta abordagem, é essencial a presença de hidrótropos, como por exemplo, o etanol. Esta classe de compostos em alta concentração é capaz de dissolver lipídios insolúveis em água para criar precursor líquido e impedir a formação de bulk de cristal líquido (MEZZENGA et al., 2005; SWARNAKAR et al., 2007). A adição controlada de meio aquoso à solução mista acima reduz rapidamente a solubilidade lipídica e resulta na formação de cubossomos ou hexossomos. Essa abordagem precisa de menos energia e tem a vantagem de produzir nanopartículas com maior estabilidade (SPICER et al., 2001; CHEN et al., 2014; ZHAI et al., 2019).

Nos últimos anos, as fases cúbica e hexagonal receberam considerável atenção devido ao seu potencial como sistemas de administração de fármacos. Assim como os sistemas líquido-cristalinos, as nanodispersões de cristal líquido têm a capacidade de proteger o fármaco da degradação física e química, solubilizar fármacos lipossolúveis e fornecer uma matriz lenta de liberação de fármacos (CHEN et al., 2014; MADHESWARAN et al., 2019; ZHAI et al., 2019)

1.2.1. Fase cúbica e Cubossomos

No capítulo 1 foi escrito que as mesofases cúbicas apresentam uma bicamada lipídica bicontinua curva que se estende em três dimensões, sendo separadas por canais de fase aquosa e, portanto, formando uma estrutura tridimensional. Além disso, a fase cúbica pode ser dividida em três tipos: a fase cúbica diamante duplo ($Pn3m$), a fase cúbica primitiva ($Im3m$) e a fase

cúbica tireoidiana (Ia3d) (SHAH et al., 2001; LARSSON, 2000; CHEN et al., 2014; AZMI et al., 2015; MEZZENGA et al., 2019), como pode ser visto na Figura 26.

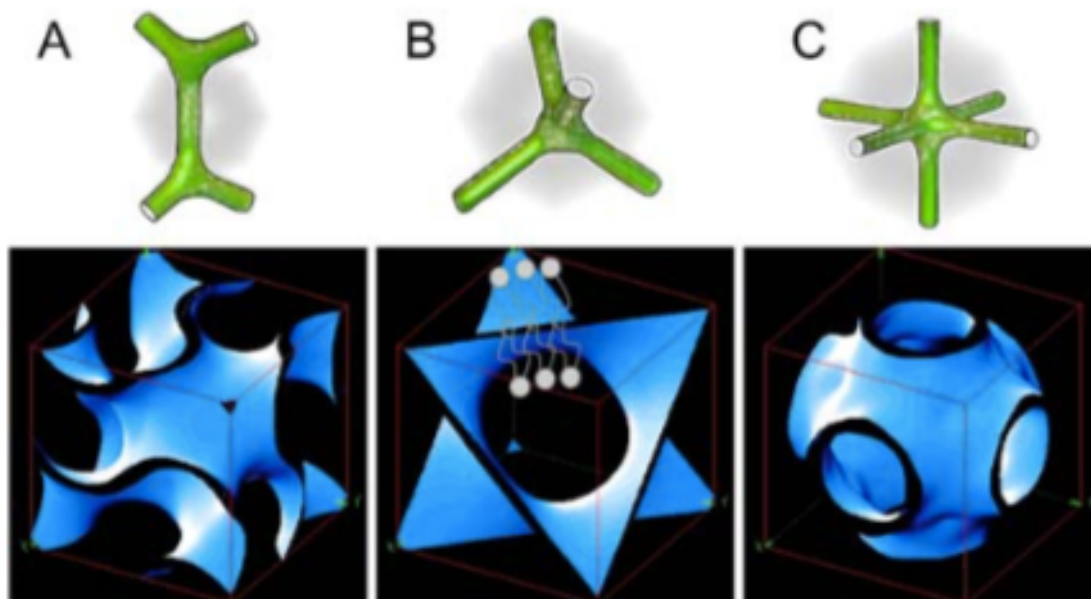


Figura 26. Apresentação esquemática das fases (A) cúbica tireoidiana (Ia3d), cúbica diamante duplo (Pn3m) e (C) cúbica primitivo (Im3m). Fonte: RAPPOLT, 2006.

As fases cúbicas bicontínuas Pn3m e Im3m apresentam um equilíbrio termodinâmico com excesso de água, o que abre uma vasta gama de aplicações possíveis.

Os cubossomos são nanopartículas de cristal líquido de fase cúbica e, portanto, apresentam as mesmas características estruturais da fase cúbica dos cristais líquidos.

1.3. Monooleína

Monooleína (MO), com o nome químico 1-Monoolein [1- (cis-9-Octadecenoil) -rac-glicerol], é um líquido viscoso, âmbar claro ou amarelo pálido (GANEM-QUINTANAR et al., 2000), insolúvel em água e álcool frio, mas muito solúvel em óleo e clorofórmio (KULKARNI et al., 2011) e possui amplas aplicações nas indústrias farmacêutica e de alimentos, devido às suas propriedades biodegradáveis e biocompatíveis (MADHESWARAN et al., 2019).

A MO contém uma cadeia de hidrocarbonetos não polares, ligado a uma estrutura de glicerol com dois grupos hidroxila polar por uma ligação éster, como pode ser visto na Figura 27 (KULKARNI et al., 2011), sendo capaz de formar diversas fases de sistemas anfífilos, incluindo fases lamelar, hexagonal e cúbica (BARAUSKAS et al., 2005). Essas diferenças na automontagem da MO são influenciadas por vários fatores físico-químicos que resultam na formação de uma série de fases. Isso inclui o comprimento da cadeia de hidrocarbonetos lipídicos, a saturação, a temperatura e o teor de água (MADHESWARAN et al., 2019).

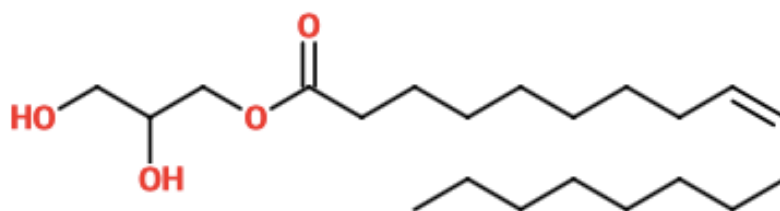


Figura 27. Estrutura química da monooleína.

1.4.DOTAP

DOTAP, também conhecido como 1, 2-dioleoyl-3-trimethylammonium- propane é um lipídio catiônico, podendo conferir propriedade adesivas à formulação (Tran et al. 2018). A sua estrutura química está ilustrada na Figura 28.

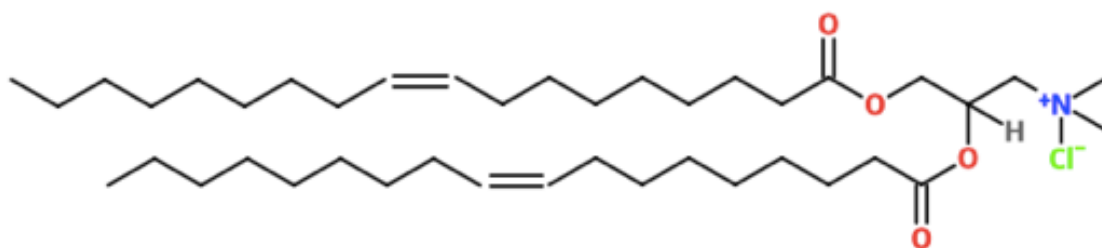


Figura 28. Estrutura química do DOTAP.

1.5. Poloxamer 427

Pluronic®F127 é um polímero tribloco linear não-iônico, solúvel em água, que contém um seguimento central hidrofóbico de óxido de polipropileno (PPO) entre dois blocos de óxido de polietileno (PEO) (KOJARUNCHITT et al., 2011), conforme a Figura 29 e atua como um agente estabilizador. Portanto esse polímero é muito utilizado para estabilizar nanopartículas de cristal líquido (AKHLAGHI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016).



Figura 29. Estrutura química do Pluronic F127.

Este trabalho incluiu um tópico atual, que é a busca de um novo sistema de entrega e uma formulação que possa apresentar direcionamento ativo para oferecer efeito aprimorado nas células cancerígenas, o que contribuiria diretamente para a consolidação de pesquisas científicas no Brasil e no mundo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas líquidos cristalinos (SLCs) e nanopartículas líquidas cristalinas (NPLCs) carregadas com curcumina.

2.1. Objetivos específicos

- Desenvolver sistemas líquido-cristalinos e nanodispersões de cristal líquido contendo curcumina;
- Caracterizar as formulações por espalhamento de raios X de baixo ângulo, tamanho de partícula e polidispersividade (Pdl) e microscopia eletrônica de transmissão criogênica (MET-Crio);
- Avaliar a eficiência de encapsulação da curcumina nas nanopartículas;
- Avaliar os perfis de liberação, permeação e retenção *in vitro* da curcumina;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Principais reagentes e matérias-primas:

- Acetonitrila grau CLAE (J.T. Baker®, USA);
- Acetato de sódio trihidratado (Sigma Aldrich®);
- Ácido acético (Synth®, Brasil);
- Ácido oléico (Synth®, Brasil);
- Água Ultrapurificada (Milli-Q®);
- Clorofórmio (Merk®, Brasil);
- Coluna Sephadex G-25 (GE Healthcare);
- Curcumina (Inlab®, Brasil);
- Etanol (Sigma Aldrich®, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico (Synth®, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Synth®, Brasil);
- Metanol (Sigma Aldrich®, Alemanha);

- Polietilenoimina (25 kDa) (Sigma Aldrich®, Alemanha);
- Pluronic F-127 (BASF, U.S.A);
- Propilenoglicol (Synth, Brasil);
- Quitosana de baixo peso molecular (Lubrizol, USA.);
- Span 60 (Audaz, Brasil).

Principais equipamentos:

- Agitador magnético com aquecimento (Fisatom, modelo 752^a);
- Balança analítica (METTLER, modelo H10);
- Balança semi-analítica (Shimadzu, modelo AW220);
- Banho ultrassônico (Elma E120H – Elmasonic);
- Células de difusão de Franz (Microette Plus – Hanson Research Corporation®);
- Coluna Zorbax C18 250 mm x 4.6mm, 5µm (Agilent, EUA);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE, Agilent);
- DLS (Dynamic Light Scattering) – Nano-ZS (Zetasizer®);
- Estufa modelo 702.780 (Quimis®, Brasil);
- Micrometro Mitutoyo;
- Sistema de purificação de água MILLIPORE®, Milli – Q Plus, condutividade 18,2µS.cm-1;
- Sonicador – Processador Ultrassonico (Hielscher®, Alemanha)
- Turrax (Ultra Turrax Quimis®);
- Vortex Mixer (KASVI basic).

3.2. Métodos

3.2.1. Desenvolvimento dos sistemas líquidos cristalinos (Bulk) (SLCs)

Os bulks dos sistemas líquidos cristalinos (SLCs) foram desenvolvidos conforme protocolos descritos por Martiel e colaboradores (2015). Foram utilizados monooleína (MO), ácido oleico (AO), 1,2-di-oleil-3 trimetil-amônio-propano (DOTAP) que é um lipídio catiônico e uma dispersão de PEI 2,5% e QS 2,5%. Os lipídios e a fase aquosa foram pesados em um tubo. Diferentes proporções dos constituintes foram testadas para a formação do sistema. Os lipídios foram dissolvidos num co-solvente, depois o co-solvente foi evaporado para obter uma solução homogênea. Após, o sistema foi hidratado com a dispersão de PEI e QS e tampão. Em

seguida, a formulação foi centrifugada para obter o bulk. A curcumina foi incorporada na concentração final de 0,5 mg / mL.

3.2.2. Desenvolvimento das nanopartículas líquidas cristalinas (NPLCs).

As nanopartículas líquidas cristalinas (NPLCs) foram desenvolvidas de acordo com o protocolo descritos por Martiel et al., 2015. Foi utilizada mononoleína (MO) e DOTAP. Os lipídios e a fase aquosa foram pesados em um tubo. Diferentes proporções dos constituintes foram testadas para a formação do sistema. Os lipídios foram dissolvidos num co-solvente, depois o co-solvente foi evaporado para obter uma solução homogênea. Depois, o sistema foi hidratado com uma solução contendo um estabilizador e, em seguida, a formulação foi sonicada a 45% de amplitude em ciclos de 0,8s por 5 minutos para obter as nanopartículas. A curcumina foi incorporada na concentração final de 0,5 mg / mL.

3.2.3. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A identificação das mesofases e os parâmetros estruturais das amostras lipídicas foram determinados por medições pelo SAXS realizadas em um instrumento Bruker AXS Micro com uma fonte de raios X microfocada, operando em tensão e corrente de filamento de 50 kV e 1000 μ A, respectivamente. A radiação Cu K α ($\lambda_{\text{Cu K}\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$) foi colimada por um Kratkycolimador 2D e os dados foram coletados por um detector 2D Pilatus 100 K. O vetor de dispersão $q = (4 \pi / \lambda) \sin \theta$, com 2θ sendo o ângulo de dispersão, foi calibrado usando behenato de prata. Os dados foram coletados e calculados a média azimutal usando o software Saxsgui para produzir intensidade unidimensional versus vetor de espalhamento q , com um intervalo q de 0,004 a 0,5 $\text{\AA}^{-1}$. As amostras das nanodispersões foram preenchidas em capilares de quartzo com 2 mm de diâmetro, os quais foram selados com cola epóxi (UHU). As medições foram realizadas a 25,0°C e 37,0°C e a intensidade dispersa foi coletada ao longo de 5 h. O parâmetro de rede da fase hexagonal (d) foi calculado de acordo com a equação 1 e da fase cúbica (a) de acordo com a equação 2:

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

onde q_1 é a posição do primeiro pico (FONSECA et al., 2016)

$$a = \frac{2\pi}{q} \sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$$

(Equação 2)

onde q é o vetor de espalhamento, h , k e l são índices de Miller do pico de Bragg (JABLONOWSKA et al., 2016).

3.2.4. Medida do tamanho de partícula e índice de polidispersividade

O tamanho de partícula e suas distribuições foram medidos por espalhamento dinâmico de luz usando um instrumento zetasizer Zen3600 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) usando cubetas descartáveis. As amostras foram diluídas em tampão antes da análise e cada amostra foi medida em triplicata. Os índices de refração foram fixados em 1,47 e 1,33, para lipídios e água, respectivamente, e a temperatura foi mantida em 25,0°C e 37,0°C durante as medições. O software calcula o raio hidrodinâmico, assumindo partículas esféricas, usando a relação de Stoke-Einstein para descrever o movimento browniano das partículas (BOGE et al., 2018).

3.2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica (MET-Crio)

As amostras foram preparadas em um sistema de vitrificação de ambiente controlado, mantido a 25 ° C com umidade próxima à saturação, para evitar a evaporação da amostra durante a preparação. Uma gota das NPLCs, diluídas 5X em MilliQ, foi colocada em um filme de polímero revestido de carbono suportado por uma grade de cobre, suavemente secada com um papel de filtro para formar um filme líquido fino (10 - 500 nm) e imediatamente mergulhada em etano líquido a -180 ° C para vitrificação. A grade das amostras foi então mantida à temperatura de nitrogênio líquido e transferida para um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss LIBRA-120 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) operado a 80kV no modo de campo claro com perda zero. As imagens digitais foram gravadas em condições de baixa dose com um sistema de câmera TRS CCD de varredura lenta (TRS GmbH, Alemanha) e o software iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Alemanha). Um baixo foco de 1-3 μm foi usado para aumentar o contraste (BOGE et al., 2018).

3.2.6. Validação da metodologia analítica para quantificação da curcumina pelo leitor de microplacas

A validação da metodologia analítica foi realizada utilizando um leitor de microplacas da TECAN e realizada utilizando os parâmetros: linearidade, exatidão, precisão intra-corrida e

intermediária, limite de detecção e limite de quantificação, de acordo com as Diretrizes Harmonizadas da Tripartite (ICH, 2005). Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19. Parâmetros utilizados na validação da metodologia analítica.

Agitação	Orbital
Duração	5 segundos
Amplitude	3mm
Frequência	218.3 rpm
Temperatura	37,0°C
Comprimento de onda	425

3.2.7. Eficiência de encapsulação

A determinação da CUR encapsulada foi realizada usando a cromatografia por exclusão de tamanho utilizando uma coluna Sephadex G-25. A amostra (200 uL) foi adicionada na coluna Sephadex e eluída utilizando tampão acetato pH 4,4 como fase móvel. As frações eluídas foram monitoradas por medições de turbidez a 425 nm usando um leitor de microplacas. Foram coletadas cerca de 60 frações. Em seguida, as frações com turbidez semelhantes foram unidas e solubilizadas em etanol e a concentração de CUR foi analisada em um leitor de microplacas a 425 nm. A concentração da solução adicionada na coluna Sephadex foi considerada como 100% e a concentração obtida após a eluição nas frações correspondentes à CUR encapsulada foi comparada com esse valor, resultando no grau de encapsulação das amostras. O experimento foi realizado em triplicatas, fornecendo o valor do erro.

3.2.8. Ensaio de liberação, permeação e retenção *in vitro*

3.2.8.1. Avaliação da cinética de liberação *in vitro* da curcumina

O estudo da liberação da CUR livre e incorporada nas formulações foi realizado no equipamento Microette (Hanson), composto por células de difusão de Franz. Utilizou-se membrana de polietersulfona e uma solução receptora composta por 15% de propilenoglicol, 1% Span® 60, 5% de etanol e tampão acetato de pH 4,4 qsp à 37,0°C ± 0,5°C. As formulações foram pré-pesadas (300 mg do bulk e 500 µl das nanodispersões) e transferidas para o anel doador disposto no compartimento doador da célula de difusão de Franz. As amostras foram coletadas no compartimento receptor em tempos predeterminados (5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2h, 4h, 6h, 8h e 12h). Para a nanopartícula, o fármaco livre foi removido usando uma coluna

sephadex antes de ser transferido para o compartimento doador. A quantidade de CUR liberada das formulações foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Agilent) com comprimento de onda de 425 nm a partir do método analítico validado por Fonseca-Santos et al. (2017), usando a equação $y = 129,58x - 6,4816$ ($R^2 = 0,9999$).

3.2.8.2. Ensaio de permeação e retenção *in vitro* da curcumina

O ensaio de permeação *in vitro* da CUR livre e incorporada nas formulações também foi realizado no equipamento Microette (Hanson), composto por células de difusão Franz e utilizou-se uma solução receptora composta por propilenoglicol a 15%, Span® 60 a 1%, Span® 60 a 1%, etanol a 5% e tampão fosfato pH 4,4 qsp à $37,0^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ e com agitação a 300 rpm. Para realizar este teste, primeiramente, foram adquiridas mucosas vaginais de porcos. Antes de cada experimento, a espessura da mucosa foi medida usando o micrômetro Mitutoyo. Qualquer mucosa fora de especificação não foi usada no experimento. Posteriormente, as mucosas foram colocadas na parte superior da célula de Franz. As amostras (CUR livre e incorporadas nas formulações) foram transferidas para o anel doador disposto no compartimento doador da célula de difusão de Franz. As amostras foram coletadas do compartimento do receptor em tempos predeterminados (5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h). A CUR permeada foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Agilent) com comprimento de onda de 425 nm a partir do método analítico validado, usando a equação $y = 129,58x - 6,4816$ ($R^2 = 0,9999$).

A extração do fármaco retido na mucosa vaginal da porca foi realizada de acordo com o método adaptado de Victorelli (2018). Após 12 horas de experimento, as mucosas foram removidas do compartimento doador das células Franz. A área da mucosa exposta à formulação foi levemente limpa com papel higiênico, cortada e picotada em pedaços pequenos com uma tesoura. Os fragmentos obtidos foram colocados em tubos de centrífuga de 50 ml (Falcon, BD®, Franklin Lakes, EUA), nos quais foram adicionados 4 ml de metanol e homogeneizados em Turrax® a 10.000 rpm por 2 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados no banho ultrassônico por 30 minutos. Posteriormente, a CUR presente no sobrenadante foi quantificada por HPLC (Agilent) com comprimento de onda de 425 nm a partir do método analítico validado, usando a equação $y = 138.797x - 10.007$ ($R^2 = 1.000$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Desenvolvimento dos sistemas líquidos cristalinos (Bulk) (SLCs)

CUR, MO, DOTAP e AO foram pesados, conforme Tabela 20, e misturados em clorofórmio para dissolver os reagentes e homogeneizar a mistura. Depois que o solvente foi deixado evaporar completamente usando um evaporador rotativo, a mistura foi deixada no vácuo durante a noite para secar.

Tabela 20. Componentes da fase oleosa

Amostra	Monooleína	Curcumina	DOTAP	Ácido Oleico
MO	100%	-	-	-
MOCUR	95%	5%	-	-
MODOTAP	95%	-	5%	-
MOCURDOTAP	90%	5%	5%	-
MODOTAP_QSPEI	95%	-	5%	-
MOCURDOTAP_QSPEI	90%	5%	5%	-
MOAO	80%	-	-	20%
MOCURAO	75%	5%	-	20%
MOAO_QSPEI	80%	-	-	20%
MOCURAO_QSPEI	75%	5%	-	20%

MO: monooleína/ CUR: curcumina/ AO: ácido Oleico/ QS: quitosana/ PEI: polietilenoimina

As formulações finais contendo a razão de fase oleosa/fase aquosa de 60:40 foram preparadas pesando as quantidades apropriadas de tampão acetato pH 4,4 e dispersão de QS e PEI, de acordo com a Tabela 21.

Tabela 21. Componentes dos bulks

Grupos	Amostras	MO	CUR	DO TAP	AO	QS+PEI 2,5%	Tampão acetato
A	MO	60%	-	-	-	-	40%
B	MOCUR	57%	3%	-	-	-	40%
C	MODOTAP	57%	-	3%	-	-	40%
D	MOCURDOTAP	54%	3%	3%	-	-	40%
E	MODOTAP_QSPEI	57%	-	3%	-	10%	30%
F	MOCURDOTAP_QSPEI	54%	3%	3%	-	10%	30%
G	MOAO	48%	-	-	12%	-	40%
H	MOCURAO	45%	3%	-	12%	-	40%
I	MOAO_QSPEI	48%	-	-	12%	10%	30%
J	MOCURAO_QSPEI	45%	3%	-	12%	10%	30%
(CH)							

MO: monooleína/ CUR: curcumina/ AO: ácido Oleico/ QS: quitosana/ PEI: polietilenoimina.

A mistura foi homogeneizada por aquecimento, misturada em vórtex e centrifugação. A fase de cristal líquido nos tubos foi então equilibrada em temperatura ambiente por 24 horas, antes do SAXS.

4.2. Desenvolvimento das nanopartículas líquidas cristalinas (NPLCs).

Foi adicionado tampão de acetato pH 4,4 contendo 1,5% de poloxamer 127 na amostra contendo monooleína, DOTAP e curcumina na proporção 10:90 (gel: tampão), de acordo com a Tabela 22.

Tabela 22. Componentes das nanopartículas.

Grupos	Amostras	Monooleína	Curcumina	DOTAP	Acetate Buffer 4,4
K	MODOTAP	9,5%	-	0,5%	90%
L	MOCURDOTAP (NPLCs)	9%	0,5%	0,5%	90%

As amostras foram deixadas em repouso a 40 ° C por algumas horas para entrar em equilíbrio e depois foram misturadas no vortex por 1 minuto, aquecidas e novamente misturadas

no vortex por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram sonicadas a 45% de amplitude em ciclos de 0,8s por 5 minutos. A Figura 30 ilustra a formulação em cada etapa.

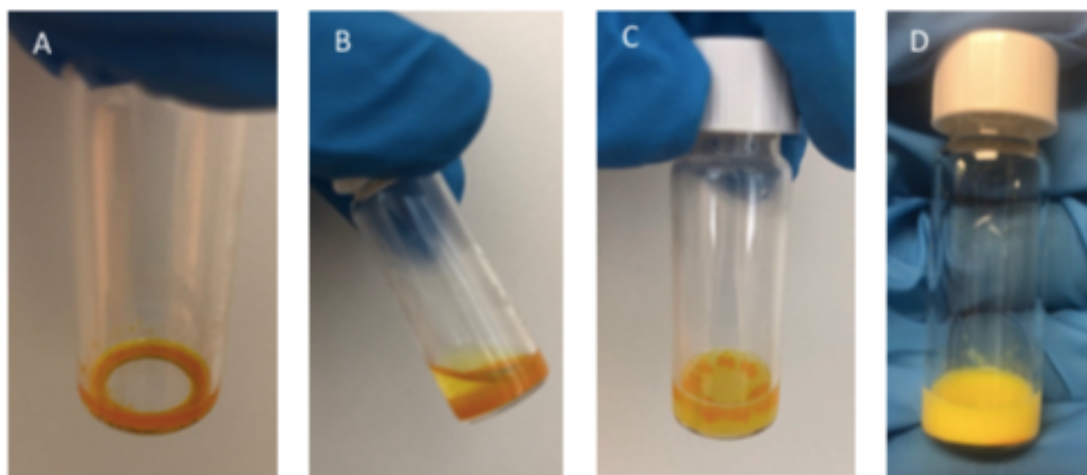


Figura 30. Figura (A) mostra a MO, DOTAP fundido com CUR. Figura (B) mostra a formulação com excesso de tampão de acetato pH 4,4. Figura (C) mostra a formulação depois de ter sido aquecida e agitada por vortex. Figura (D) mostra a formulação após a sonicação.

As formulações contendo ácido oleico e / ou dispersão de QS e PEI não mostraram um resultado satisfatório de tamanho e PDI. Então, será necessários estudos adicionais para alterar alguns parâmetros no sonicador ou tentar outra metodologia de aplicação de energia.

4.3. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As caracterizações do bulk e NPLCs foram realizadas com e sem CUR. As medidas foram realizadas à 25,0°C e temperatura vaginal (37,0°C). As estruturas dos sistemas líquido-cristalino foram encontradas calculando-se as distâncias interplanares, d , usando a lei de Bragg.

Os resultados do SAXS do bulk estão mostrados nas Figuras 31 a 33.

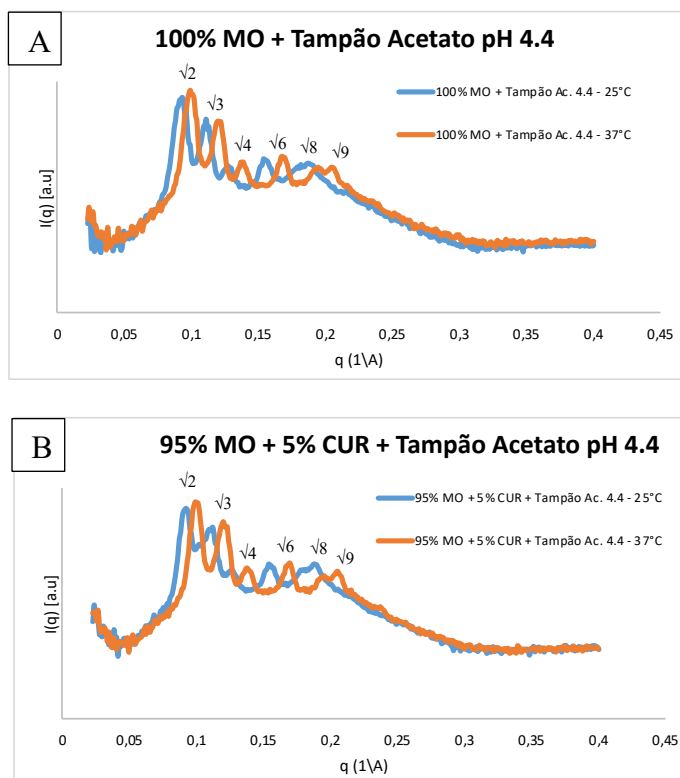
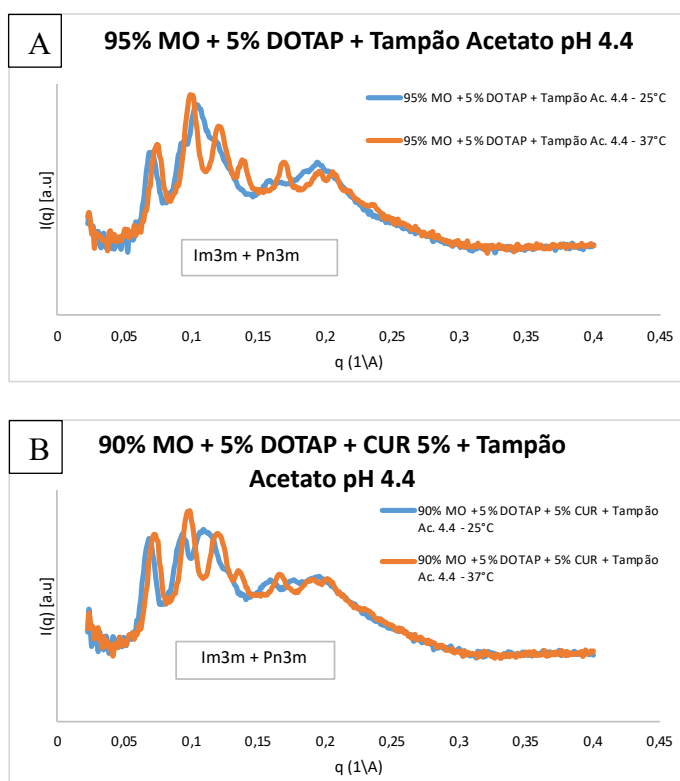


Figura 31. SAXS das formulações A e B. A linha azul mostra a análise à 25,0°C e a linha laranja mostra a análise à 37,0°C. A Figura (A) mostra a análise da amostra com 100% de MO e tampão acetato de pH 4,4. A Figura (B) mostra a análise da amostra com 95% de MO, 5% de CUR e tampão acetato pH 4,4. Abreviações: MO é monooleína e CUR é curcumina.



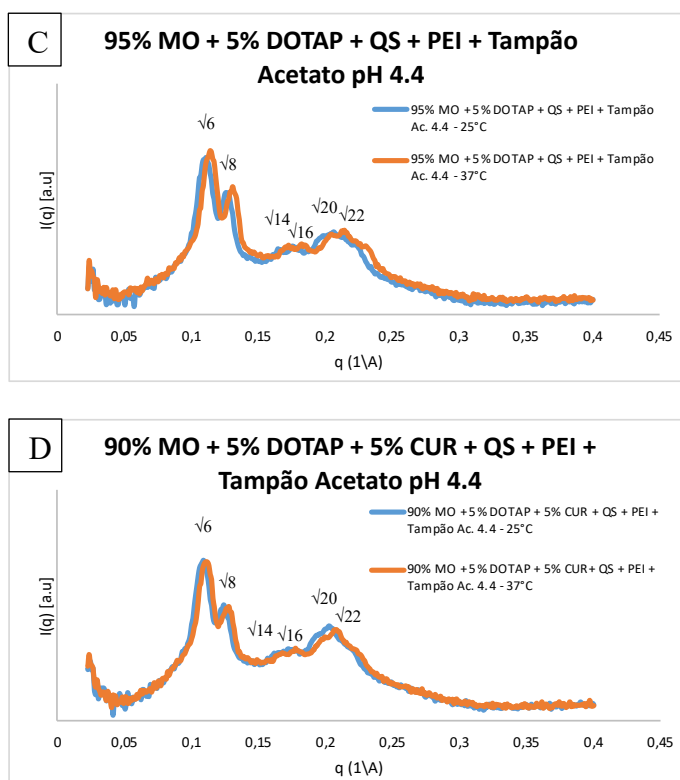
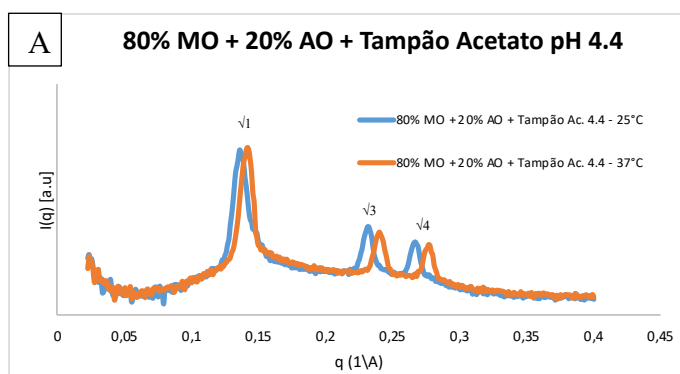


Figura 32. SAXS das formulações C, D, E e F. A linha azul mostra a análise à 25,0°C e a linha laranja mostra a análise à 37,0°C. A Figura (A) mostra a análise da amostra com 95% de MO, 5% de DOTAP e tampão acetato de pH 4,4. A Figura (B) mostra a análise da amostra com 90% de MO, 5% de DOTAP, 5% de CUR e tampão acetato pH 4,4. A Figura (C) mostra a análise da amostra com 95% de MO, 5% de DOTAP e QS + PEI + tampão acetato pH 4,4. A Figura (D) mostra a análise da amostra com 90% de MO, 5% de DOTAP, 5% de CUR e QS + PEI + tampão acetato pH 4,4. Abreviações: MO é monooleína, CUR é curcumina, DOTAP é 1,2-di-oleil-3 trimetil-amônio-propano, QS é quitosana e PEI é polietilenimina.



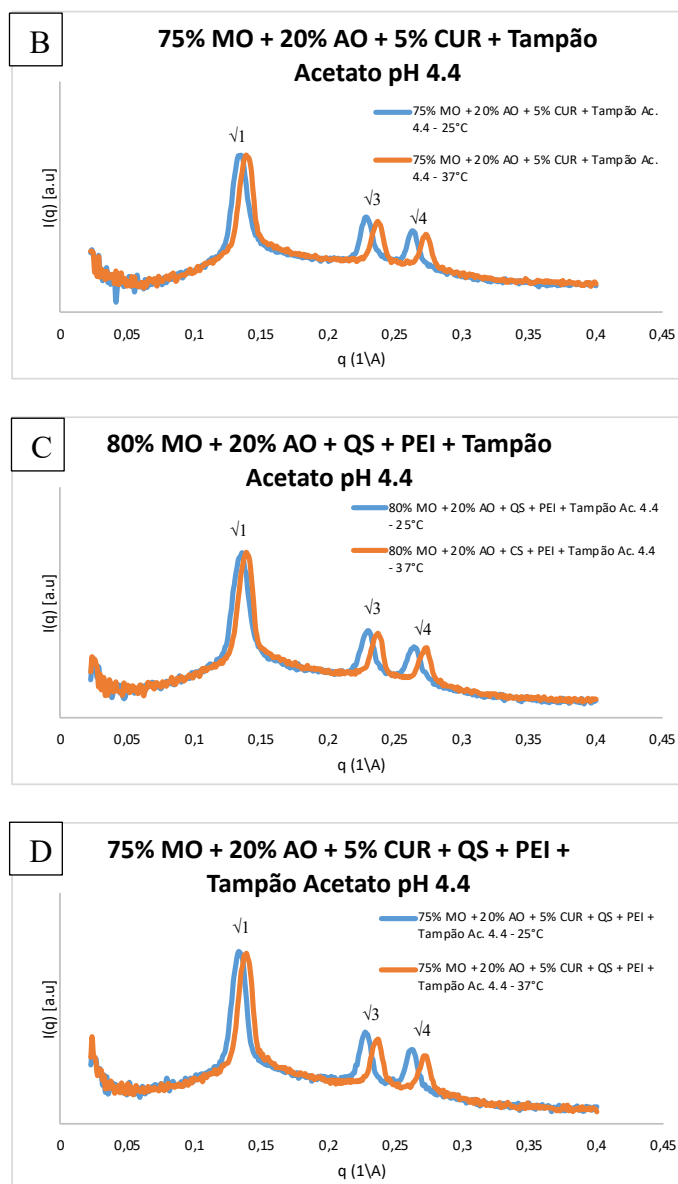


Figura 33. SAXS das formulações G, H, I e J. A linha azul mostra a análise à 25,0°C e a linha laranja mostra a análise à 37,0°C. A Figura (A) mostra a análise da amostra com 80% de MO, 20% de AO e tampão de acetato pH 4,4. A Figura (B) mostra a análise da amostra com 75% de MO, 20% de AO, 5% de CUR e tampão acetato pH 4,4. A Figura (C) mostra a análise da amostra com 80% de MO, 20% de AO, 10% de QS + PEI e tampão de acetato pH 4,4. A Figura (D) mostra a análise da amostra com 75% de MO, 20% de AO, 5% de CUR, 10% de QS + PEI e tampão de acetato pH 4,4. Abreviações: MO é monooleína, AO é ácido oleico, CUR é curcumina, QS é quitosana e PEI é polietilenimina.

Foi possível verificar que as amostras somente com MO e CUR apresentaram fase cúbica Pn3m em ambas as temperaturas. As amostras com MO, DOTAP e CUR apresentaram fase cúbica Im3m e Pn3m (fase de coexistência) em ambas as temperaturas. As amostras com MO, DOTAP, dispersão de QS e PEI e curcumina apresentaram fase cúbica Ia3d em ambas as temperaturas. Enquanto as amostras com MO, AO, dispersão de QS e PEI e CUR apresentaram fase hexagonal em ambas as temperaturas.

Portanto, os resultados mostraram que a adição de curcumina, DOTAP, dispersão de QS e PEI e a mudança de temperatura não alteraram a fase do sistema líquido cristalino. No entanto, a adição de ácido oleico mudou a fase do sistema de cúbico para hexagonal.

Devido a limitação da aquisição do reagente DOTAP, foi escolhido a formulação composta por MO, AO e dispersão de QS +PEI, nomeada como CH, como o bulk para a realização dos ensaios de caracterização e liberação, permeação e retenção *in vitro*.

Os resultados do SAXS das formulações de nanopartículas são mostrados na Figura 34.

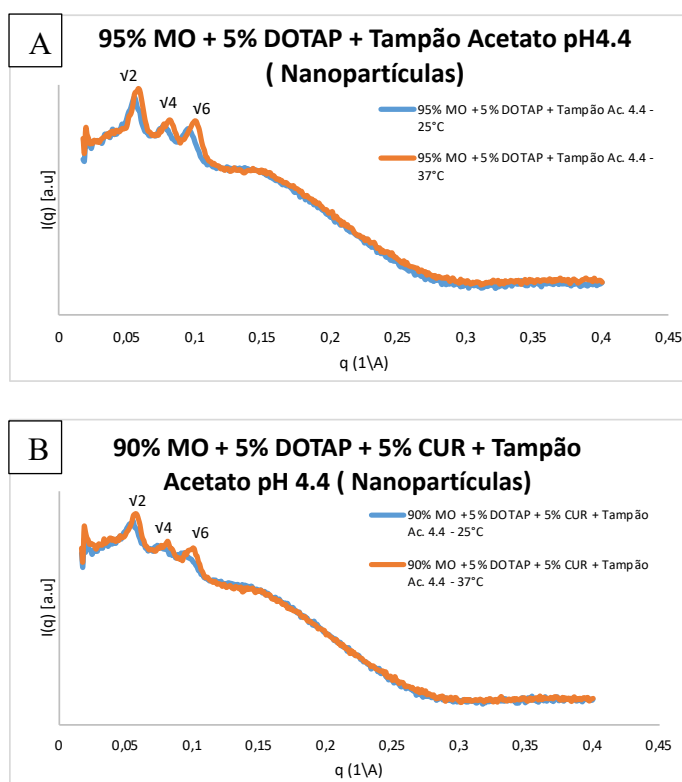


Figura 34. SAXS das nanodispersões K e L. A linha azul mostra a análise à 25,0°C e a linha laranja mostra a análise à 37,0°C. A Figura (A) mostra a análise da amostra com 95% de MO, 5% de DOTAP e tampão acetato de pH 4,4. A Figura (B) mostra a análise da amostra com 90% de MO, 5% de DOTAP, 5% de CUR e tampão acetato pH 4,4. MO é monooleína, CUR é curcumina, DOTAP é 1,2-di-oleil-3 trimetil-amônio-propano.

Foi possível verificar que as nanopartículas com MO, DOTAP e Curcumina apresentaram fase cúbica Im3m em ambas as temperaturas.

4.4. Medida do tamanho de partícula e índice de polidispersividade

O tamanho de partícula e o índice de polidispersividade (Pdl) das nanopartículas líquidos cristalinas foram analisados pelo método de espalhamento de luz (DLS) em um aparelho Zetasizer (Malvern Instruments). O tamanho de partícula / Pdl foi determinado à 25,0°C e 37,0°C. Os resultados em triplicado são mostrados na Tabela 23.

Tabela 23. Tamanho das partículas e PDI pelo método de dispersão dinâmica da luz à 25,0°C e 37,0°C.

Amostras	Tamanho de partícula (nm) PDI		Tamanho de partícula (nm) PDI	
	25,0°C		37,0°C	
MODOTAP	167,66 ± 1,48	0,126 ± 0,014	170,28 ± 2,52	0,144 ± 0,013
MOCURDOTAP	166,67 ± 5,73	0,173 ± 0,039	182,71 ± 9,95	0,278 ± 0,041

Foi possível observar que houve formação de partículas nanométricas com PDI dentro da faixa ideal considerada entre 0,2 e 0,4 (SAUPE et al., 2006; SATO et al., 2015). A adição de CUR aumentou o PDI e o aumento da temperatura também aumentou o PDI e o tamanho das partículas.

4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica (MET-Crio)

As fotomicrografias obtidas pela análise MET- Crio foram mostradas na Figura 35.

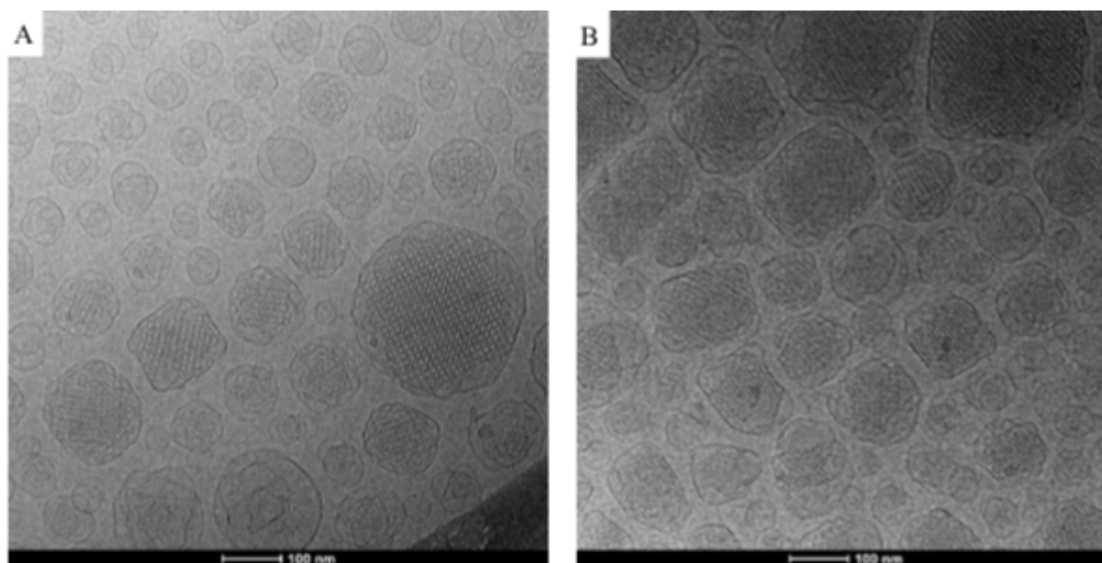


Figura 35. Fotomicrografias de nanopartículas de cristal líquido obtidas por análise de microscopia eletrônica de transmissão criogênica. A Figura (A) mostra as nanopartículas sem a presença de curcumina e a Figura (B) mostra as nanopartículas com a presença de curcumina.

A microscopia eletrônica de transmissão criogênica mostrou a formação de vesículas e cubossomos bem formados, estruturas tipicamente formadas em dispersões de monooleína. Embora a figura mostre partículas de vários tamanhos, o PDI da formulação é baixo, menor que 0,3.

Esposito e colaboradores (2005) realizaram MET-Crio com dispersões de MO e obtiveram imagens semelhantes a essa, caracterizando a formação de cubossomos. Wu e colaboradores desenvolveram cubossomos utilizando PEG-maleimida, MO e Pluronic F127 para a liberação sustentada do peptídeo Odorrana- lectin. A formação da estrutura cúbica foi confirmada através de MET-Crio onde foi possível observar a presença de cubossomos e vesículas.

4.6. Validação da metodologia analítica para quantificação da curcumina pelo leitor de microplacas

O método analítico para análise de CUR foi realizado utilizando um leitor de microplacas - TECAN, de acordo com o procedimento descrito em 3.6. O espectro de absorvância de CUR é mostrado na Figura 36.

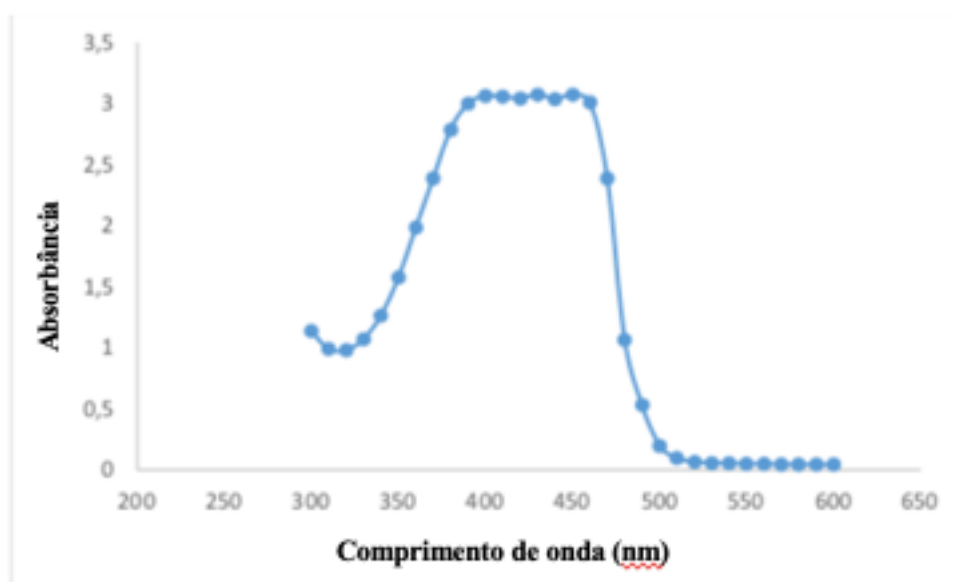


Figura 36. Espectro de absorvância de CUR.

4.6.1. Linearidade

A relação entre as áreas cromatográficas e a concentração de CUR foi linearmente correlacionada no intervalo de 2,5 µg/ml a 30 µg/ml. A regressão linear desses valores forneceu $R^2 = 0,9994$ (Figura 37).

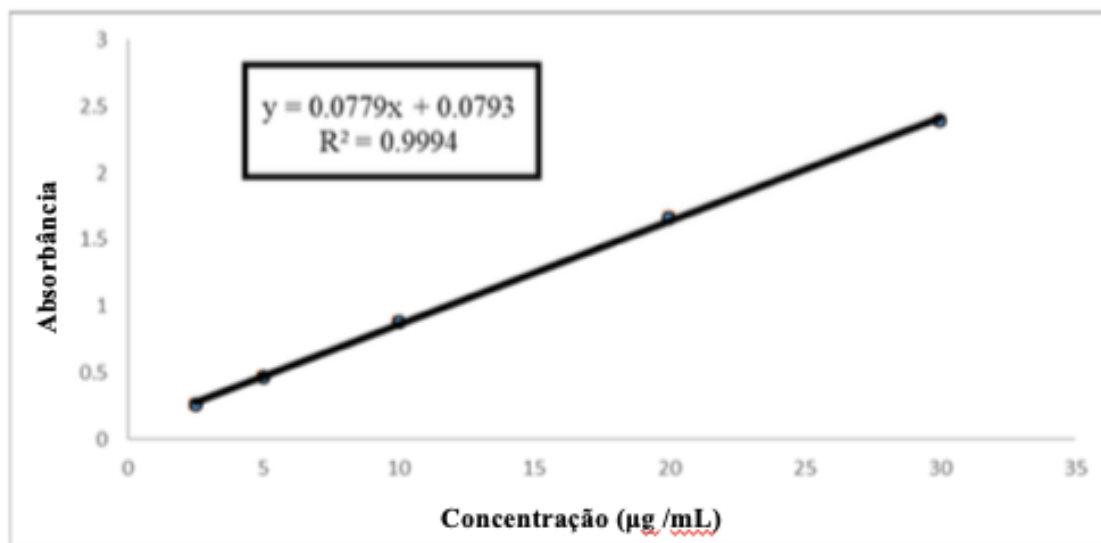


Figura 37. Curva de calibração da CUR.

O limite de detecção do método foi de 0,227 µg/mL e o limite de quantificação foi 0,688 µg / mL, calculado a partir dos valores obtidos para três curvas diferentes, com valores de concentração variando de 2,5 µg/mL a 30 µg/mL.

4.6.2. Precisão e Exatidão

A exatidão foi calculada como a porcentagem de recuperação. A Tabela 24 ilustra a exatidão, que variou entre 85,87 e 102,28%. A precisão desse método foi determinada pela repetibilidade em um mesmo dia, usando três concentrações diferentes da CUR: 2,5; 10 e 30 µg/mL. Todas as concentrações foram analisadas em triplicatas. Além disso, a precisão intermediária entre os dias foi avaliada usando essas três concentrações diferentes. O coeficiente de variação (CV) em ambos os casos foi inferior a 5%, confirmando resultados satisfatórios.

Tabela 24. Precisão e exatidão do método espectrofotômetro UV-visível para análise da CUR.

	Concentração Teórica (µg/mL)	Recuperação (µg/mL)	Exatidão (%)	CV (%)
Intra-dia (n=3)	2,5	2,28	91,14	0,95
	10	10,23	102,28	2,58
	30	29,72	99,06	2,77
Inter-dia (n=3)	2,5	2,15	85,87	0,48
	10	9,74	97,36	0,16
	30	28,25	94,17	0,38

4.7. Eficiência de encapsulação

Considerando que a curcumina se degrada em solução aquosa (TØNNESSEN et al., 1985), foi possível minimizar sua degradação usando um tampão com pH 4,4. Em soluções mais ácidas, o CUR tende a degradar menos. A quantidade de curcumina nas formulações com tampão acetato pH 4,4 é mostrada na Tabela 25:

Tabela 25. Concentração teórica e real das nanopartículas.

pH	Concentração	Concentração	(%)
	Teórica (µg/mL)	Real (µg/mL)	
4,4	5000	4638,6	92,8

De acordo com a concentração de 4638,6 µg / mL de CUR, foi possível verificar que a eficiência de encapsulação da CUR foi de 20,2%, o que representa cerca de 937 µg/ml (0,937 mg/mL). A formulação após a passagem pela coluna sephadex é mostrada na Figura 38.

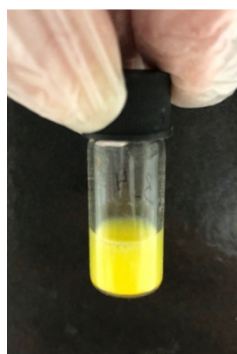


Figura 38. Formulação final - cubossomos carregados com curcumina.

Observou-se que não houve incorporação de 100% da CUR adicionada na formulação. Isso pode ter ocorrido devido à natureza dos sistemas e às características do fármaco. Por se tratar de um sistema anfifílico, os fatores de incorporação do fármaco devem estar relacionados a essa incorporação, como solubilidade e miscibilidade do fármaco na fase lipídica (FO), estrutura química e física da matriz lipídica e, finalmente, o polimorfismo estrutural da estrutura a ser incorporada, principalmente por ser uma droga lipofílica (MÜLLER et al., 2000). Assim, a composição lipídica da própria nanodispersão pode limitar o encapsulamento da CUR, devido à solubilidade limitada do fármaco na nanodispersão de cristais líquidos.

4.8. Ensaio de liberação, permeação e retenção *in vitro*

4.8.1. Avaliação da cinética de liberação *in vitro* da curcumina

A CUR é um fármaco lipofílico e não é solúvel em água. Portanto, para que o meio receptor siga as condições sink, é necessário adicionar surfactantes e solventes orgânicos, como o etanol. No entanto, os cubossomos são destruídos na presença de surfactantes e solventes orgânicos. Assim, a metodologia proposta para o estudo de liberação é uma boa opção, pois a formulação é adicionada sobre a membrana e o meio receptor não passa em grande quantidade através da membrana. Portanto, o meio receptor não está em contato direto com a formulação, como é possível ver na Figura 39.

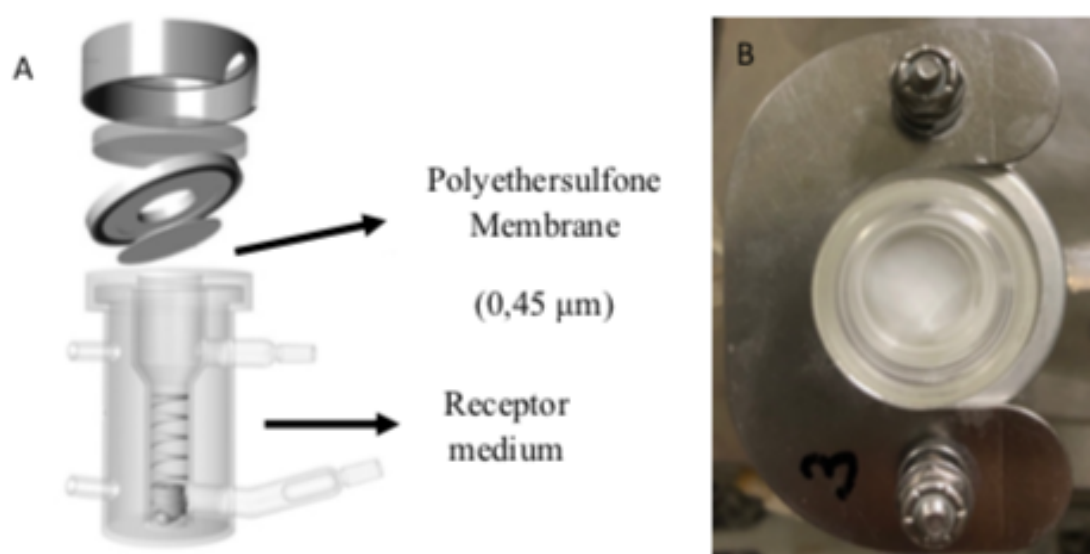


Figura 39. A Figura (A) mostra que a membrana foi colocada sobre o meio receptor. A Figura (B) mostra que o meio receptor não passou pela membrana de polietersulfona.

Ao estudar o perfil de liberação do CUR a partir dos sistemas, foi possível verificar a quantidade de fármaco liberado em função do tempo.

Testes de liberação *in vitro* foram realizados nos bulks de MO, AO, CUR e dispersão de QS e PEI (CH) e nanopartículas (NPLCs) e CUR em ácido oleico. O objetivo deste experimento foi avaliar o perfil de liberação de CUR das formulações e em ácido oleico através da membrana de polietersulfona de 0,45 µm.

As Figuras 40 e 41 demonstram as taxas de liberação de CUR das formulações de CH e NPLCs. A formulação CH e NPLCs liberaram 1,82% e 42,04%, respectivamente. No entanto, a taxa de liberação do CUR em ácido oleico foi de 4,20% em 12 horas. Como o CUR precipitou em ácido oleico na concentração de 0,5% o mesmo utilizado nas formulações, a liberação foi muito baixa. Isso indica que as formulações são capazes de dissolver muito melhor a CUR do que o ácido oleico e, em seguida, podem liberar e controlar mais a taxa de liberação do medicamento.

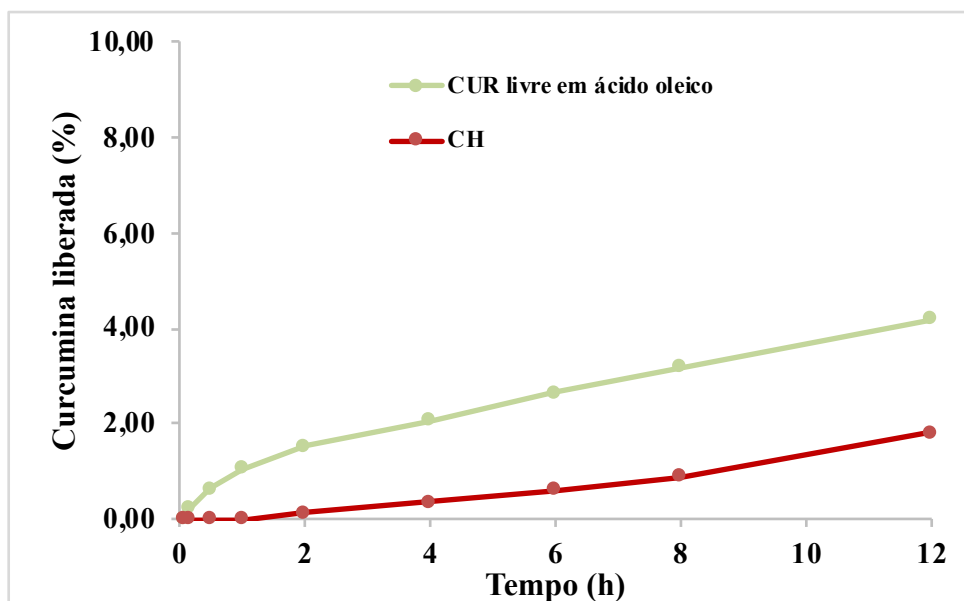


Figura 40. Perfil de liberação *in vitro* (%), com membrana de poliétersulfona 0,45 μm , de CUR incorporada na formulação CH contendo CUR 3% e suspensão contendo CUR 0,5%. Abreviações: CUR, curcumina. CH é a formulação composta por 45% de monooleína, 12% de ácido oleico e 40% de fase aquosa contendo 0,25% de quitosana e 0,25% de polietilenoimina. Os coeficientes de variação das análises foram inferiores a 10% em todos os casos.

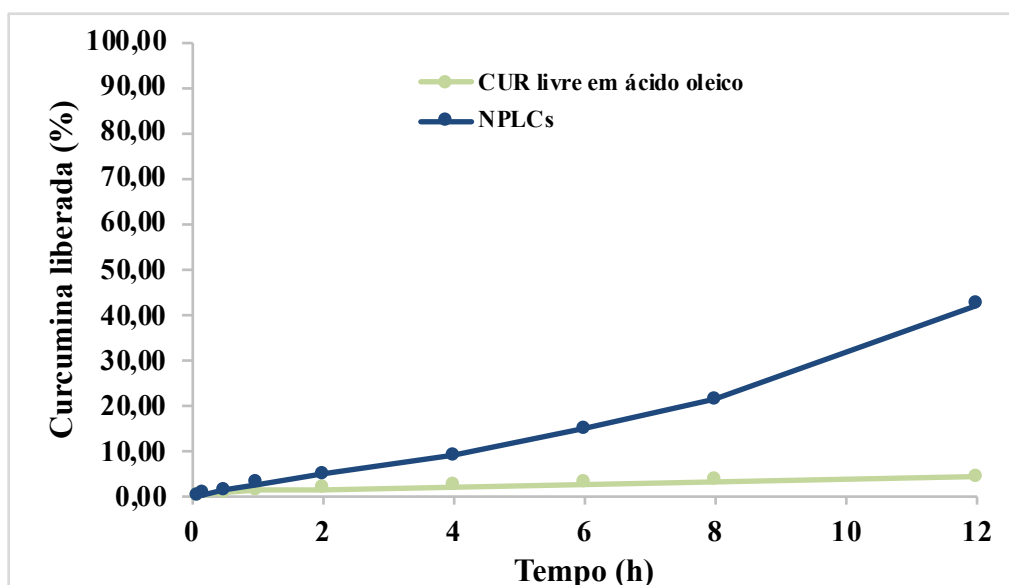


Figura 41. Perfil de liberação *in vitro* (%), com membrana de poliétersulfona 0,45 μm , de CUR incorporada na formulação NPLCs contendo CUR 0,1% e suspensão contendo CUR 0,5%. Abreviações: CUR, curcumina. NPLCs é a formulação composta por 9% de monooleína, 0,5% de DOTAP e 90% de fase aquosa. Os coeficientes de variação das análises foram inferiores a 10% em todos os casos.

A formulação CH mostra uma taxa muito baixa de liberação de CUR. Apesar desta formulação apresentar fase hexagonal e apresentar uma taxa de liberação de droga mais lenta (BOYD et al., 2006), é possível observar que a baixa taxa de liberação de CUR das formulações é provavelmente devida à membrana utilizada no experimento. Rodero et al. 2018 descobriram

que a CUR na solução liberava cerca de 38% em 12 horas e que o cristal líquido liotrópico liberava menos de 10% da CUR através da membrana de polissulfona. Entretanto, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, foi possível observar que o sistema com CUR incorporado apresentava atividade antifúngica contra *Candida albicans* e era mais eficaz no controle da infecção vaginal, mesmo com baixa taxa de liberação de CUR.

As NPLCs mostraram uma taxa mais alta de liberação do fármaco que a formulação CH. Pode-se explicar que, além dos compostos dos sistemas serem diferentes, os NPLCs apresentam excesso de água na formulação, o que pode auxiliar na liberação do fármaco.

4.8.2. Ensaio de permeação e retenção *in vitro* da curcumina

Os ensaios de permeação e retenção são válidos para estimar as interações que a formulação constitui com a mucosa, mostrando como o fármaco se difunde e verificando se o fármaco será ou não retido na mucosa.

Foi possível verificar que o fármaco não permeou a mucosa vaginal no experimento com CUR em AO, bulk de MO, AO, CUR e dispersão de QS e PEI (CH) e nanopartículas (NPLCs).

A quantidade de fármaco (%) retida na mucosa é mostrada na Tabela 26.

Tabela 26. Retenção de CUR livre em AO, CH e NPLCs na mucosa vaginal.	
Amostras	Retenção (%)
CUR livre em AO	11,83 ± 9,46
CH	1,11 ± 1,07
NPLCs	8,88 ± 0,08

O estudo de retenção mostrou que a CUR livre em ácido oleico reteve mais CUR na mucosa vaginal do que na formulação de CH. Isto é devido à CUR no ácido oleico ter precipitado na mucosa. A formulação de CH reteve 1,11% enquanto as NPLCs retiveram mais, 8,88%. Este resultado pode ser atribuído à maior taxa de liberação das NPLCs.

Assim, podemos sugerir que ambas as formulações são adequadas para uso tópico, onde é desejado um efeito local do fármaco, como a CUR.

Esposito e colaboradores (2005) desenvolveram cubossomos por emulsificação e homogeneização da MO e poloxamer em água. Os autores incorporaram o anti-inflamatório indometacina no sistema para administração percutânea. Através de estudos *in vivo* baseados em espectrofotometria de refletância da pele e fita adesiva, verificou-se que a indometacina incorporada nos cubossomos pode ser liberada de maneira prolongada, demonstrado que os

cubossomos desenvolvidos com MO foram capazes de controlar a absorção percutânea de indometacina.

Boge e colaboradores (2019) investigaram o uso de cubossomos para administração tópica do peptídeo antimicrobiano (AMP) LL-37. Os autores observaram empregando modelo de epiderme *in vitro* que os cubossomos não apresentaram potencial de irritação da pele, permitindo a administração tópica. Além disso, a propriedade de morte bacteriana dos cubossomos foi examinada por um modelo de infecção de ferida na pele de porco *ex vivo* com *Staphylococcus aureus* e verificou-se que o LL-37 em cubossomos matou as bactérias, sendo um sistema de liberação de fármaco promissor.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as misturas de monooleína e ácido oleico (fase oleosa) e fase aquosa (com ou sem QS e PEI) foram capazes de formar SLCs de fase hexagonal e as misturas de monooleína, DOTAP e tampão acetato pH 4,4 com 1,5% de poloxamer foram capazes de formar NPLCs de fase cúbica. As NPLCs apresentaram tamanho nanométrico em torno de 170 nm e baixo índice de polidispersão. Também foi demonstrado que a incorporação da CUR não alterou as características do cristal líquido.

A caracterização de NPLCs por microscopia eletrônica de transmissão criogênica evidenciou a formação de cubossomos. O estudo de eficiência de encapsulação da curcumina relatou que a taxa de incorporação da curcumina no sistema é de aproximadamente 20%.

O perfil de liberação do CUR foi controlado pelas formulações CH e NPLCs. A formulação de NPLCs reteve mais fármaco que CH, possivelmente porque esse sistema liberou mais fármaco.

No geral, os sistemas desenvolvidos demonstram ser uma abordagem interessante e inovadora para o tratamento do câncer do colo do útero.

CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 1 E CAPÍTULO 2

De acordo com o capítulo 1 e o capítulo 2, foi possível desenvolver SLCs constituídos por ácido oleico e procetyl, e ácido oleico e monooleína ambos os sistemas contendo ou não a dispersão polimérica. Foi possível também desenvolver NPLCs constituída por monooleína e DOTAP. Os sistemas líquido-cristalinos (bulk) apresentaram uma viscosidade maior do que as nanopartículas líquido cristalinas. Porém as nanopartículas apresentaram uma liberação mais rápida do que os bulks desenvolvidos de fase hexagonal e lamelar. O bulk de fase hexagonal

liberou mais lentamente e em menor quantidade do que o bulk de fase lamelar. Conclui-se que os sistemas líquido-cristalinos e nanopartículas de cristal líquido são sistemas interessantes para serem explorados como sistemas de liberação de fármacos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, sugere-se os ensaios citotóxicos *in vivo* para as formulações FW, FPC, CH e nanopartículas. Além dos ensaios citotóxicos *in vitro* para as formulações CH e nanopartículas. Seria muito interessante também verificar o perfil de textura, muco/bioadesão e estudos reológicos para a formulação CH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMAD, M.Z. et al. Progress in nanotechnology-based drug carrier in designing of curcumin nanomedicines for cancer therapy: current state-of-the-art. **Journal of Drug Targeting**. v. 24, n. 4, p. 273-293, 2015.
2. AKHLAGHI, S. P., et al. Impact of Preparation Method and Variables on the Internal Structure, Morphology, and Presence of Liposomes in Phytantriol-Pluronic[®] F127 Cubosomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 145, p. 845 – 853, 2016.
3. AZMI, I. D. M., et al. Cubosomes and hexosomes as versatile platforms for drug delivery. **Therapeutic delivery**. v. 6, n. 12, p. 1347–1364, 2015.
4. BARAUSKAS, J. et al. Self-assembled lipid superstructures: beyond vesicles and liposomes. **Nano Letters**. v. 5, p. 1615–1619, 2005.
5. BOGE, L. Cubosomes for topical delivery of the antimicrobial peptide LL-37. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 134, p. 60-67, 2019.
6. BOGE, L., et al. Freeze-dried and re-hydrated liquid crystalline nanoparticles stabilized with disaccharides for drug-delivery of the plectasin derivative AP114 antimicrobial peptide. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 522, p. 126–135, 2018.
7. BOYD, B. J.; WHITTAKER, D. V.; -M.KHOO, S.; DAVEY, G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 309, n. 1-2, p. 218–226, 2006.
8. BREMER, C. et al. In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition. **Nature medicine**. v. 7, n. 6, p. 743-748, 2001.

9. CHEN, J., et al. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. **European Journal of Pharmacology**. v. 772, p. 33-42, 2016.
10. CHEN, Y., et al. Cubic and Hexagonal Liquid Crystals as Drug Delivery Systems. **BioMed Research International**. v. 2014, 12 pages, 2014.
11. CHONG, J. Y. T., et al. Steric stabilisation of self-assembled cubic lyotropic liquid crystalline nanoparticles: high throughput evaluation of triblock polyethylene oxide-polypropylene oxide- polyethylene oxide copolymers. **Soft Matter**. v. 7, n. 10, p. 4768–4777, 2011.
12. DUVOIX, A. et al. Chemopreventive and Therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**. v. 223, n. 2, p. 181-190, 2005.
13. EGEBLAD, M. et al. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**. v. 2, n. 3, p. 161-174, 2002.
14. ESPOSITO, E. et al. Cubosome Dispersions as Delivery Systems for Percutaneous Administration of Indomethacin. **Pharmaceutical Research**. v. 22, n. 12, 2005.
15. FONSECA - SANTOS, B., et al. Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**. v. 2016, n. 11, p. 4553-4562, 2016.
16. FREITAS, L. M.; SOARES, C. P.; FONTANA, C. R.; Synergistic effect of photodynamic therapy and cisplatin: a novel approach for cervical cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 140, p. 365-373, 2014.
17. GANEM-QUINTANAR A., et al. Monoolein: A Review of the Pharmaceutical Applications. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 26, p. 809–820, 2000.
18. GHALANDARLAKI, N.; ALIZADEH, A. M.; ASHKANI-ESFAHANI, S. Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. **BioMed Research International**. v. 2014, 23 pages, 2014.
19. GUSTAFSSON, J. et al. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by a nonionic amphiphilic polymer. **Langmuir**. v. 13, n. 26, p. 6964–6971, 1997.
20. HIRLEKAR, R., et al. Hexosomes: a novel drug delivery system. **Current Drug Delivery**. v. 7, n. 1, p. 28–35, 2010.
21. ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, 2005.

22. JABŁONOWSKA, E., et al. Interactions of Lipidic Cubic Phase Nanoparticles with Lipid Membranes. **American Chemical Society**. v. 32, p. 9640-9648, 2016.
23. INCA Instituto Nacional de Câncer. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>Acesso em: 01 Janeiro 2020.
24. KOIVUNEN, Erkki et al. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. **Nature biotechnology**. v. 17, n. 8, p. 768-774, 1999.
25. KOJARUNCHITT, T., et al. Development and characterisation of modified poloxamer 407 thermoresponsive depot systems containing cubosomes. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 408, p. 20–26, 2011.
26. KULKARNI, C. V., et al. Monoolein: a magic lipid? **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 13, p. 3004–3021, 2011.
27. KUNNUMAKKARA, A. B.; ANAND, P.; AGGARWAL, B. B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. **Cancer Letters**. v. 269, n. 2, p. 199-225, 2008.
28. LANCELOT, A.; SIERRA, T.; SERRANO, J.L. Nanostructured liquid- crystalline particles for drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**. v. 11, n. 4, p. 1–18, 2014.
29. LARSSON, K. Aqueous dispersions of cubic lipid-water phases. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**. v. 5, n. 1-2, p. 64–69, 2000.
30. LEE, A. Y. L. et al. Curcumin Inhibits Invasiveness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma Through Reducing Matrix Metalloproteinase 2, 9 and Modulating p53-E-Cadherin Pathway. **Integrative Cancer Therapies**. v. 14, n. 5, p. 484–490, 2015.
31. MADHESWARAN, T., et al. Current potential and challenges in the advances of liquid crystalline nanoparticles as drug delivery systems. **Drug Discovery Today**. v. 24, n. 7, p. 1405-1412, 2019.
32. MARTIEL, I., et al. Oil Transfer Converts Phosphatidylcholine Vesicles into Non-Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline Particles. **Langmuir**. v. 31, n. 1, p. 96-104, 2015.
33. MEZZENGA, R. et al, Nature-Inspired Design and Application of Lipidic Lyotropic Liquid Crystals. **Advanced Materials**. v. 31, n. 35, p. 1-19, 2019.
34. MEZZENGA, M. et al. Shear rheology of lyotropic liquid crystals: a case study. **Langmuir**. v. 21, n. 8, p. 3322– 3333, 2005.

35. MÜLLER, R. H.; MAÈDER, K.; GOHLA, S.; Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**. v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.
36. RAPPOLT, M. The biologically relevant lipid mesophases as “seen” by X- rays. In: Leitmannova A, ed. *Advances Planar lipid bilayers and liposomes*. Amsterdam: Elsevier book series. v. 5, p. 253–283, 2006.
37. RODRIGUES, E. C., et al. Pluronic® coated sterically stabilized magnetite nanoparticles for hyperthermia applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 416, p. 434 – 440, 2016.
38. 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.
39. SPICER, P. T. Progress in liquid crystalline dispersions: cubosomes. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**. v. 10, n. 5-6, p. 274–279, 2005.
40. SPICER, P.T., et al. Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes). **Langmuir**. v. 17, n. 19, p. 5748– 5756, 2001.
41. SUN, M., et al. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. **Nanomedicine**. v. 7, n. 7, p. 1085–1100, 2012.
42. SWARNAKAR, N. K., et al. Enhanced oromucosal delivery of progesterone via hexosomes. **Pharmaceutical Research**. v. 24, n. 12, p. 2223–2230, 2007.
43. THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nature**. v. 543, p. 378- 384, 2017.
44. TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**. v. 180, n. 5, 402 – 404, 1985.
45. TRAN, N., et al. Non-lamellar lyotropic liquid crystalline nanoparticles enhance the antibacterial effects of rifampicin against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 519, p. 107 – 118, 2018.
46. WHO World Health Organization.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>. Acesso em: 02 Janeiro 2020.
47. WORLE, G., et al. Influence of composition and preparation parameters on the properties of aqueous monoolein dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 329, n. 1-2, p. 150–157, 2007.

48. WU, H. A novel small Odorranalectin-bearing cubosomes: Preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on amyloid-b25–35-treated rats following intranasal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 80, p. 368–378, 2012.
49. YAGHMUR, A.; GLATTER, O. Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 147-148, p. 333–342, 2009.
50. ZHAI J., et al. Non-Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline Lipid Nanoparticles for the Next Generation of Nanomedicine. **ACS Nano**. v. 13, p. 6178–6206, 2019.