



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Biociências e

Biotecnologia Aplicadas à Farmácia



**Avaliação do potencial de sistemas precursores
de cristais líquidos mucoadesivos para
administração nasal de rifampicina
aplicáveis na terapia da tuberculose**

KAREN CRISTINA DOS SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Araraquara - SP

2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Biociências e

Biotecnologia Aplicadas à Farmácia



**Avaliação do potencial de sistemas precursores
de cristais líquidos mucoadesivos para
administração nasal de rifampicina
aplicáveis na terapia da tuberculose**

KAREN CRISTINA DOS SANTOS

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

Araraquara - SP

2018

Ficha Catalográfica

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

S237a Santos, Karen Cristina dos
Avaliação do potencial de sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração nasal de rifampicina aplicáveis na terapia da tuberculose / Karen Cristina dos Santos. – Araraquara, 2018.
150 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração em Microbiologia.

Orientador: Marlus Chorilli.
Coorientador: Fernando Rogério Pavan.

1. Rifampicina. 2. Tuberculose. 3. Cristal líquido. 4. Via nasal. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Pavan, Fernando Rogério, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Karen Cristina dos Santos

Avaliação do potencial de sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração nasal de rifampicina aplicáveis na otimização da terapia da tuberculose

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 31 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marlus", written over a horizontal line.

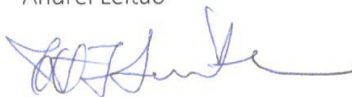
Marlus Chorilli

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Nereide Stela Santos Magalhães", written over a horizontal line.

Nereide Stela Santos Magalhães

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Andrei Leitão", written over a horizontal line.

Andrei Leitão

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Clarice Queico Fujimura Leite", written over a horizontal line.

Clarice Queico Fujimura Leite

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rosângela Gonçalves Peccinini", written over a horizontal line.

Rosângela Gonçalves Peccinini

Dedico esse trabalho à minha mãe Leiva e aos meus irmãos Katia e Kariston (in memoriam), que lutaram, sorriram e choraram comigo. Me guiaram desde os meus primeiros passos, me mostrando o caminho de uma vida honrada.

E quando já podia andar sozinha, vocês me ensinaram que o amor é incondicional; me mostraram que não importa o caminho que eu siga, nem quão longe eu esteja, eu nunca estarei sozinha.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter renovado minhas forças quando achava que as tinha perdido, por ter criado caminhos onde eu não enxergava mais saída e principalmente pelo privilégio de estar aqui.

Agradeço à minha família pelo apoio e por entender minha ausência nas longas horas de trabalho no laboratório nos finais de semana. E se não bastasse, por estar comigo mesmo quando eu passava dias sem ligar pelo excesso de trabalho durante minha estadia fora do país.

Agradeço à minha companheira, confidente e amiga Leticia pelo apoio emocional, pelas infinitas horas perdidas me dando ânimo quando as coisas davam errado, pelos dias que passou corrigindo e me auxiliando na escrita desta tese, pela paciência dispensada em meus momentos de nervosismo; agradeço principalmente por me ensinar o verdadeiro significado de parceria e mostrar isso na prática nos piores momentos da minha vida. Sem você provavelmente eu não estaria aqui!

Ao meu orientador Professor Dr. Marlus Chorilli, pela orientação, por ter me acolhido em seu grupo quando eu cheguei totalmente desmotivada e desacreditada da minha capacidade como pesquisadora, pela paciência, perseverança, por compreender minha “teimosia” e acreditar nela, pelas infindáveis conversas, não mais como professor e orientador, mas como amigo. Agradeço especialmente por ter confiado a mim realização a realização desse gratificante trabalho.

Ao professor Dr. Fernando Rogério Pavan por abrir as portas de seu laboratório de ensaios celulares e microbiológicos, pela coorientação e pelo conhecimento compartilhado; sua participação foi fundamental na realização deste trabalho.

À professora Mercedes Gonzalez-Juarrero, do *Department of Microbiology, Immunology, and Phatology - Colorado State University*, por ter me recebido em seu grupo, pela infinita paciência quando nossa comunicação era limitada, por me dar todo suporte necessário, por confiar em mim na realização de um trabalho paralelo que já gerou frutos; Mercedes, meu muito obrigada!

À Camila Maríngolo Ribeiro, pela preciosa ajuda nos ensaios de cinética bacteriana. Obrigada por sempre ser gentil e solícita ao me auxiliar e esclarecer minhas dúvidas.

À Camila Fernanda Rodero, pelas incontáveis vezes que recorri a você para me ajudar nos experimentos; pelos dias, noites e fins de semana que abdicou da sua vida para estar comigo em longas horas de bancada, sempre com um sorriso no rosto e cheia de otimismo. Aquela frase que sempre digo é realmente verdadeira: “ Eu não sei o que faria sem você! ”

A Camila, Mariana e Jessica, pelo companheirismo quando tudo dava errado, pelas risadas, pelo auxílio emocional, pelas inúmeras vezes que na hora do desespero no laboratório íamos comer e tudo ficava bem; obrigada por terem se feito presentes durante todo o período em que estive fora do país, pela paciência quando eu visualizava mensagem e só respondia “ok” (ou esquecia de responder), pelas demonstrações de carinho via Skype, quando a solidão e saudade apertavam. Sou grata principalmente por poder chamar vocês de amigas para todas as horas!

Aos colegas do laboratório de tecnologia farmacêutica, pela disposição em ajudar sempre que necessário, pela amizade e bom relacionamento durante esse período de convivência.

À Professora Rosângela Peccinini, pela colaboração nos ensaios farmacocinéticos e disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP. Aos professores por todo o conhecimento transmitido e por todas as colaborações; a todos os funcionários que - direta e indiretamente - tornaram possível o bom desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio concedido.

Ao CNPQ pelos auxílio concedido para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelas bolsas de doutorado no país e exterior (Processos 2015/00023-6 e 2016/20622-4, respectivamente).

“Não vejo nenhuma contradição entre ciência e fé: pertencem a duas esferas diferentes. Nós, cientistas, seríamos muito ambiciosos e arrogantes se imaginássemos que podemos explicar a origem do mundo”.

Fabiola Gianotti (1960)

Diretora-geral do CERN – Organização Européia para a Pesquisa Nuclear

RESUMO

A tuberculose (TB) é a principal doença infecciosa de origem bacteriana no mundo, levando anualmente à morte de milhares de pessoas e ocasionando prejuízos econômicos globais de aproximadamente 12 bilhões de dólares ao ano. Apenas um fármaco foi desenvolvido contra cepas multirresistentes desde 1960 (bedaquilina) e o surgimento de casos de TB multi-fármaco-resistente faz com que o tratamento atual seja ineficaz. A rifampicina (RIF) é um fármaco de primeira escolha usada no tratamento da TB utilizado desde 1966. Normalmente, este fármaco é administrado pela via oral, ficando assim susceptível à metabolização pré-sistêmica e interações medicamentosas com outros fármacos, o que reduz significativamente seus níveis séricos e de outros fármacos, podendo diminuir a eficácia do tratamento e aumentar o risco de resistências. Assim, o emprego de sistemas de liberação nanoestruturados e de vias alternativas de administração podem ser estratégias atraentes para a administração de RIF. A via nasal tem recebido especial atenção como rota promissora para liberação sistêmica de fármacos, uma vez que apresenta epitélio com numerosas microvilosidades e grande área de superfície, o que facilita a absorção de fármacos. Além disto, a anatomia da cavidade nasal oferece entrada para o Sistema Nervoso Central (SNC), aspecto extremamente interessante para casos de tuberculose meníngea. Dentre os sistemas nanoestruturados promissores para incorporação de RIF objetivando administração nasal, destacam-se os sistemas líquido cristalinos mucoadesivos. Devido à alta viscosidade de alguns domínios destes sistemas, eles podem promover a fixação da formulação num local de ação desejado após sua administração e formação *in situ*, o que pode ser interessante para a administração de RIF, de forma a aumentar a sua fixação na região nasal, facilitando sua absorção sistêmica e interface com o SNC. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial de sistemas líquido cristalinos mucoadesivos para administração nasal de RIF na otimização da terapia da TB, com avaliação *in vitro* e *in vivo* da sua segurança e atividade. Após o desenvolvimento de 6 diagramas de fases, foram selecionadas 6 formulações fixando a concentração de tensoativo em 50%, sendo caracterizados por microscopia de luz polarizada, espalhamento de raio-X a baixo ângulo, reologia, análise de textura e bioadesão que demonstraram a presença de sistemas líquidos cristalinos constituídos de mesofases lamelar e hexagonal e também sistemas precursores de cristal líquido (microemulsão) que com a adição de soluções aquosas formaram mesofases significativamente mais estruturadas e mucoadesivas. Ensaio de citotoxicidade por difusão em Agar utilizando a linhagem celular L-929 revelaram citotoxicidade branda a moderada das formulações testadas. Dois sistemas líquido cristalinos foram selecionados, sendo eles 9D e 10D. No ensaio de cinética bacteriana os sistemas 9D e 10D carreando RIF apresentaram atividade bactericida sobre a cepa H37rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Posteriormente ensaios farmacocinéticos foram realizados sugerindo que a absorção nasal da RIF carregada por tais sistemas é de 2 a 4 vezes maior utilizando a via nasal quando comparada à administração oral. Dessa forma, os sistemas desenvolvidos podem apresentar potencial para incorporação de RIF, com o objetivo de serem usados como plataforma tecnológica na liberação de fármacos na terapia contra a TB.

Palavras-chave: rifampicina; tuberculose; cristal líquido; via nasal.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is the world's leading bacterial infectious disease, causing thousands of people to die every year and causing global economic damage of about \$ 12 billion a year. Only one drug has been developed against multiresistant strains since 1960 (bedaquilin) and the emergence of multidrug-resistant TB cases makes the current treatment ineffective. Rifampicin (RIF) is a first-line drug used in the treatment of TB used since 1966. This drug is commonly administered orally, thus being susceptible to pre-systemic metabolism and drug interactions with other drugs, which significantly reduces its serum levels and other drugs and may decrease the effectiveness of treatment and increase the risk of resistance. Thus, the use of nanostructured delivery systems and alternative routes of administration may be attractive strategies for administration of RIF. The nasal route has received special attention as a promising route for systemic drug delivery, since it presents epithelium with numerous microvilli and large surface area, which facilitates the absorption of drugs. In addition, the anatomy of the nasal cavity provides access to the Central Nervous System (CNS), an extremely interesting aspect for cases of meningeal tuberculosis. Among the promising nanostructured systems for the incorporation of RIF for nasal administration, we highlight the mucoadhesive liquid crystal systems. Due to the high viscosity of some domains of these systems, they can promote the fixation of the formulation at a desired site of action after administration and in situ formation, which may be of interest for the administration of RIF, in order to increase its fixation in the region nasal, facilitating its systemic absorption and interface with the CNS. Thus, the objective of this work was to study the potential of mucosal liquid crystal systems for nasal administration of RIF in the optimization of TB therapy, with in vitro and in vivo evaluation of its safety and activity. After the development of 6 ternary phase diagrams, 6 formulations were selected, fixing the concentration of surfactant in 50%, being characterized by polarized light microscopy, low angle X-ray scattering, rheology, texture analysis and bioadhesion that demonstrated the presence of liquid crystalline systems consisting of lamellar and hexagonal mesophases and also liquid crystal precursor systems (microemulsion) which with the addition of aqueous solutions formed significantly more structured and mucoadhesive mesofases. Agar diffusion cytotoxicity assays using the L-929 cell line revealed mild to moderate cytotoxicity of the formulations tested. In the bacterial kinetics assay the 9DR and 10DR systems showed bactericidal activity on the H37rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Thus, the developed systems may have potential for incorporation of RIF, with the objective of being used as a technological platform in the release of drugs in the therapy against TB.

Keywords: rifampicin; tuberculosis; liquid crystal; nasal route.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas moleculares dos compostos utilizados na constituição dos sistemas formados.	23
Figura 2: Representação esquemática de um diagrama de fases ternário genérico.....	28
Figura 3: Layout da placa de seis poços utilizada no método de difusão em ágar.	36
Figura 4: Representação esquemática do procedimento realizado para obtenção dos diagramas binários.	49
Figura 5: Diagramas de fases A, B e C, contendo regiões segundo classificação baseada no aspecto visual.	51
Figura 6: Diagramas de fases D, E e F, contendo regiões segundo classificação baseada no aspecto visual.	51
Figura 7: Diagrama de fases A, B, C, D, E, e F contendo regiões segundo classificação por mesofases.	60
Figura 8: Diagramas D, E e F, evidenciando o ponto de origem e o ponto onde o sistema se localiza após a diluição com FNS 1:1 (m/m).	63
Figura 9: Fotomicrografias dos sistemas 9D, 10D, 9E, 10E, 9F e 10F.	63
Figura 10: Fotografia do sistema 9EQS, contendo 0,1 % de quitosana	65
Figura 11: Fotografia do sistema 9EQS contendo rifampicina.	66
Figura 12: Reogramas dos sistemas 9D, 10D, 9E, 10E, 9F e 10F (curva ascendente – Ida / curva descendente – volta).	69
Figura 13: Reogramas dos sistemas 9EQS, 10EQS, (curva ascendente – Ida / curva descendente – volta.	70
Figura 14: Reogramas dos sistemas 9DRIF, 10DRIF, 9ERIF, 10ERIF, 9FRIF e 10FRIF (curva ascendente – Ida / curva descendente – volta.	71
Figura 15: Reogramas dos sistemas 9D, 10D, 9E, 10E, 9F e 10 F com adição de FNS (curva ascendente – Ida / curva descendente – volta (continua).	72
Figura 16: Reogramas dos sistemas 9DR, 10DR, 9ER, 10ER, 9FR e 10FR com adição de FNS (curva ascendente – Ida / curva descendente – volta.	74
Figura 17: Reogramas dos sistemas 9DR, 10DR, 9ER, 10ER, 9FR e 10FR (curva ascendente – Ida / curva descendente – volta.	77

Figura 18: Reogramas demonstrando a variação do módulo de armazenagem G' e de perda G'' em função da frequência para os sistemas 9D, 10D, 9E, 10E, 9F e 10F.....	79
Figura 19: Reogramas demonstrando a variação do módulo de armazenagem G' e de perda G'' em função da frequência para os sistemas 9EQS, 10EQS.	80
Figura 20: Reogramas demonstrando a variação do módulo de armazenagem G' e de perda G'' em função da frequência para os sistemas 9DRIF, 10DRIF, 9ERIF, 10ERIF, 9FRIF e 10FRIF.	81
Figura 21: Reogramas de varredura de frequência obtidos para os 9D, 10D, 9E, 10E, 9F, e 10F sistemas com FNS.....	82
Figura 22: Reogramas demonstrando a variação do módulo de armazenagem G' e de perda G''	83
Figura 23: Reogramas obtidos para os sistemas 9DR, 10DR, 9ER, 10ER, 9FR e 10FR e reogramas dos mesmos sistemas com adição de FNS. (continua)	85
Figura 24: Gráficos ilustrando os valores de dureza, compressibilidade, adesão e coesão dos sistemas iniciais 9D, 10D, 9E, 10E, 9F e 10F.	89
Figura 25: Gráfico ilustrando os valores de dureza, compressibilidade, adesão e coesão dos sistemas 9EQS, 10EQS, 9E e 10E.....	91
Figura 26: Gráfico ilustrando os valores de dureza, compressibilidade, adesão e coesão dos sistemas 9DRIF, 10DRIF, 9ERIF, 10ERIF, 9FRIF e 10FRIF.	92
Figura 27: Gráficos ilustrando os valores das forças mucoadesivas dos sistemas 9D, 10D, 9E, 10E, 9F e 10F isolados e na presença de FNS.	93
Figura 28 Gráfico ilustrando os valores de pico de mucoadesão (P_{MA}) e Trabalho de mucoadesão (T_{MA}) dos sistemas 9E e 10E, com e sem quitosana.....	94
Figura 29: Gráfico ilustrando os valores de pico de mucoadesão (P_{MA}) e trabalho de mucoadesão (T_{MA}) dos sistemas 9DRIF, 10DRIF, 9ERIF, 10ERIF, 9FRIF e 10FRIF.....	95
Figura 30: Curvas das intensidades de espalhamento em função do vetor de espalhamento q	97
Figura 31: Curvas de DSC dos sistemas 9FR, 9ER, 9DR, 10FR, 10ER, 10DR.	101
Figura 32 : curva representando o número de bactérias viáveis em $\text{Log}_{10} \text{UFC.ml}^{-1}$ em função do tempo de exposição em dias.....	107
Figura 33 - Cromatogramas típicos de plasma controle (a) e de solução de trabalho (b) obtidos nas mesmas condições.....	112
Figura 34: Curva de calibração obtida para a faixa linear de trabalho (20 a 15000 ng ml^{-1}).....	113

Figura 35: Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo matemático não ponderado.	114
Figura 36: Curva de calibração ponderada obtida para a faixa linear de trabalho	115
Figura 37: Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo matemático ponderado ($1/x^2$).....	116
Figura 38 Cromatogramas típicos obtidos para a análise de rifampicina em plasma de rato (Animal 1), após a administração nasal da formulação 9D.....	118
Figura 39: Perfil de concentração plasmática de rifampicina <i>versus</i> tempo, referente a administração nasal (rifampicina carregada por sistema líquido cristalino) em ratos com dose 30mg/kg de rifampicina.	119
Figura 40: Avaliação de sistema líquido cristalino em camundongos BALB / c pós infecção aerossol de baixa dose de M. tuberculosis. As barras representam os valores médios em UFC ($\log_{10}$). Os animais foram tratados por 4 semanas com sistema líquido cristalino 9D com rifampicina, através de 3 diferentes vias de administração (grupo 0 = sem tratamento, grupo 1= administração nasal, grupo 2 = administração sublingual, grupo 3 = administração tópica).	141
Figura 41: Avaliação de sistema líquido cristalino em camundongos BALB / c após infecção aerossol de baixa dose de M. tuberculosis. As barras representam os valores médios em UFC ($\log_{10}$). Os animais foram tratados por 4 semanas com sistema líquido cristalino 9D com rifampicina, através de 3 diferentes vias de administração (grupo 0 = sem tratamento, grupo 1= administração nasal, grupo 2 = administração sublingual, grupo 3 = administração tópica).	142
Figura 42: Avaliação de sistema líquido cristalino em camundongos BALB / c após infecção aerossol de baixa dose de M. tuberculosis. As barras representam os valores médios em UFC ($\log_{10}$). Os animais foram tratados por 4 semanas com sistema líquido cristalino 9D (com rifampicina e sem rifampicina), através de 2 diferentes vias de administração (grupo 0 = sem tratamento, grupo 1= administração sublingual com rifampicina, grupo 2 = administração sublingual sem rifampicina, grupo 3 = administração tópica com rifampicina, grupo 4 = administração sublingual sem rifampicina).	143
Figura 43: Avaliação de sistema líquido cristalino em camundongos BALB / c após infecção aerossol de baixa dose de M. tuberculosis. As barras representam os valores médios em UFC ($\log_{10}$). Os animais foram tratados por 4 semanas com sistema líquido cristalino 9D (com rifampicina e sem rifampicina), através de 2 diferentes vias de administração (grupo 0 = sem tratamento, grupo 1= administração sublingual com rifampicina, grupo 2 = administração sublingual sem rifampicina, grupo 3 = administração tópica com rifampicina, grupo 4 = administração sublingual sem rifampicina).	144

Figura 44: Avaliação de sistema líquido cristalino em camundongos BALB / c após infecção aerossol de baixa dose de *M. tuberculosis*. As barras representam os valores médios em UFC ($\log_{10}$). Os animais foram tratados por 4 semanas com os sistemas líquido cristalinos 9D e 10D (com rifampicina e sem rifampicina), através da via sublingual (grupo 0 = sem tratamento, grupo 1= administração sublingual 9D sem rifampicina, grupo 2 = administração sublingual 9D com rifampicina, grupo 3 = administração sublingual 10D sem rifampicina, grupo 4 = administração sublingual 10D com rifampicina). 145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Graus de citotoxicidade para classificação das amostras.	36
Tabela 2: Sistemas carreadores selecionados.....	58
Tabela 3: Sistemas precursores de cristal líquido selecionados que seguiram para caracterização físico-química.	66
Tabela 4: Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) dos sistemas. .	75
Tabela 5: Valores de regressão linear (r), resistência do sistema (S) e do expoente viscoelástico (n) para os sistemas selecionados (continua).	87
Tabela 6: Valores de espalhamento $q_{\max}$, periodicidade lamelar e hexagonal das formulações líquido-cristalinas.....	98
Tabela 7: Dados obtidos a partir das curvas de DSC.....	100
Tabela 8: Medidas da extensão (mm) das áreas descoradas por quadrante, relativas aos ensaios de citotoxicidade (difusão em ágar).(continua).	103
Tabela 9: Resultados qualitativos de citotoxicidade obtidas para os sistemas estudados.	105
Tabela 10: Precisão e exatidão intradia e interdia. Os valores obtidos a partir de amostras de plasma controle fortificadas com rifampicina nos níveis baixo, médio e alto da faixa linear de trabalho.....	116
Tabela 11: Quantificação de rifampicina em amostras de plasma pós-processamento (mantidas a temperatura ambiente).....	117
Tabela 12: Quantificação de rifampicina em amostras de plasma congeladas (mantidas a temperatura de -20°C).	117
Tabela 13: Parâmetros farmacocinéticos com base na curva de concentração plasmática de rifampicina versus tempo, obtidas com a administração de sistemas líquido cristalinos 9D com rifampicina (9DR) e 10D com rifampicina (10DR) pela via nasal.	120
Tabela 14: Sistema líquidos cristalinos (CL) que foram testados em colaboração com Colorado State University.	135

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS GERAIS.....	24
2.1 Objetivos específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Materiais	25
3.1.1 Fármacos e medicamentos.....	25
3.1.2 Adjuvantes, solventes e reagentes	25
3.1.3 Equipamentos	26
3.2 Métodos	26
3.2.1 Análise da capacidade do tensoativo álcool cetílicoetoxilado e propoxilado (Procetyl® AWS), fosfatidilcolina e oleilamina em formar mesofases mais estruturadas em contato com fluidos aquosos	26
3.2.2 Desenvolvimento de diagramas de fases.....	27
3.2.3 Caracterização dos sistemas por microscopia de luz polarizada (MLP) ..	28
3.2.4 Seleção dos sistemas líquido-cristalinos.....	29
3.2.5 Incorporação de quitosana nos sistemas 9E e 10 E.....	29
3.2.6 Incorporação da rifampicina nos sistemas selecionados.....	29
3.2.7 Caracterização físico-química dos sistemas.....	30
3.2.7.1 Análise reológica contínua	30
3.2.7.2 Análise reológica oscilatória	30
3.2.7.3 Avaliação do perfil de textura dos sistemas líquidos cristalinos (TPA)	31
3.2.7.4 Avaliação das forças mucoadesivas.....	32
3.2.7.5 Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)	33
3.2.7.6 Análise térmica	33

3.2.7.7 Análise estatística.....	33
3.2.8 Ensaios celulares.....	33
3.2.8.1 Preparo do meio de cultura	34
3.2.8.2 Crescimento celular.....	34
3.2.8.3 Método de Difusão em Agar	34
3.2.8.4 Coleta de dados	36
3.2.8.5 Avaliação da citotoxicidade e interpretação dos resultados.....	36
3.2.9 Cinética bacteriana.....	37
3.2.10 Ensaios in vivo (farmacocinéticos).....	38
3.2.10.1 Desenvolvimento, validação e aplicação do método bioanalítico para a quantificação de rifampicina em plasma de rato	38
3.2.10.1.1 Padrão, reagentes e solventes	38
3.2.10.1.2 Preparo das soluções padrão.....	38
3.2.10.1.3 Pré-tratamento de amostra	39
3.2.10.1.4 Cromatografia líquida capilar multidimensional com detecção por espectrometria de massas (SPE-cLC-QTOF).....	40
3.2.10.1.5 Condições cromatográficas e espectrométricas	41
3.2.10.1.6 Validação do método bioanalítico para quantificação de rifampicina em plasma de rato	42
3.2.10.2 Protocolo experimental para os ensaios farmacocinéticos.....	44
3.2.10.2.1 Animais.....	44
3.2.10.2.2 Procedimento de administração nasal e oral.....	45
3.2.10.2.3 Coleta, preparo das amostras de sangue para análise	45
3.2.10.2.4 Análise farmacocinética.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

4.1 Análise da capacidade do tensoativo álcool cetílicoetoxilado e propoxilado (Procetyl® AWS), fosfatidilcolina de soja e oleilamina em formar mesofases mais estruturadas em contato com fluidos aquosos	47
4.2 Desenvolvimento de diagramas de fases ternários e pseudoternários.....	49
4.3 Incorporação de quitosana nos sistemas 9E e 10E.....	64
4.4 Incorporação de rifampicina nos sistemas selecionados.....	65
4.5 Caracterização físico-química dos sistemas.....	66
4.5.1 Análise reológica contínua	67
4.5.2 Análise reológica oscilatória	78
4.5.3 Avaliação do perfil de textura dos sistemas líquidos cristalinos (TPA) ...	88
4.5.4 Avaliação das forças mucoadesivas.....	93
4.5.5 Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)	95
4.5.6 Análise Térmica (DSC)	98
4.5.7 Ensaios Celulares	101
4.5.7.1 Método de Difusão em Ágar	102
4.5.8 Cinética bacteriana.....	106
4.5.9 Ensaios in vivo (farmacocinéticos).....	109
4.5.9.2 Desenvolvimento, validação e aplicação do método bioanalítico para quantificação de rifampicina em plasma de rato	109
4.5.9.2.1 Preparo das soluções padrão.....	109
4.5.9.2.2 Pré-tratamento de amostra	109
4.5.9.2.3 Cromatografia líquida capilar multidimensional com detecção por espectrometria de massas (SPE-cLC-TOF).....	110
4.5.9.2.4 Condições Cromatográficas	111
4.5.9.2.5 Validação do método bioanalítico para quantificação de rifampicina em plasma de rato	111
4.5.9.3 Ensaios Farmcokinéticos.....	118

5 CONCLUSÕES	122
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO	132
2 OBJETIVO GERAL	134
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	135
3.1 Sistemas precursores de cristal líquido testados no modelo animal	135
3.2 Modelo animal infectado com M. tuberculosis.....	135
3.3 Necropsia e plaqueamento dos órgãos (pulmão e baço) para determinação de CFU de M. tuberculosis.....	138
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
4.1 Sistemas precursores de cristal líquido testados no modelo animal	140
4.2 Modelo animal infectado com M. tuberculosis.....	140
5 CONCLUSÕES	146
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

INTRODUÇÃO GERAL

A redação dessa Tese foi dividida em dois capítulos.

O primeiro capítulo se destina ao desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido cristalinos, bem como estudo de citotoxicidade, cinética bacteriana e estudos farmacocinéticos. Esses estudos foram realizados em sua maioria na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

O segundo capítulo descreve a pesquisa da atividade biológica de rifampicina incorporado à sistemas líquido cristalinos através de administração sublingual em modelo animal pré-clínico de tuberculose. Esse estudo foi realizado no doutoramento sanduiche, desenvolvido na Colorado State University, sob supervisão da Profa. Dra. Mercedes Gonzalez-Juarrero.

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

Ultimamente têm sido desenvolvidos inúmeros veículos nanoestruturados com o objetivo de aumentar a seletividade, eficácia terapêutica, permitir a redução da dose total necessária de fármacos, minimizando os efeitos colaterais tóxicos, e ainda permitir o controle de liberação dos princípios ativos, além de conferir proteção aos fármacos incorporados contra o metabolismo sistêmico e a possibilidade de direcioná-los para os sítios específicos, como células e órgãos de interesse ^{1,2}.

Dentre os sistemas nanoestruturados destacam-se os sistemas de liberação nanoestruturados precursores de cristal líquido. Cristais líquidos liotrópicos são formados por moléculas de tensoativos que possuem uma região polar e uma região apolar. Em meio aquoso formam-se monocamadas com o grupo polar direcionado para a região aquosa e, após atingir a concentração micelar crítica, formam-se micelas (agregados). A estrutura das micelas pode variar de acordo com a geometria das moléculas e com a quantidade relativa de cada componente. É possível obter sistemas fluidos formados por micelas desconectadas ou interconectadas. Os sistemas desconectados são geralmente sistemas micelares simples ou microemulsões. Já nos sistemas interconectados obtêm-se estruturas de cristal líquido³.

Cristais líquidos são descritos como estruturas em escalas nanométricas de duas ou três dimensões, com características hidrofílicas e hidrofóbicas periódicas, organizadas em fases que podem variar entre hexagonais, lamelares ou cúbicas³. São também termodinamicamente estáveis e podem ser armazenadas por longos períodos sem separação de fases. Dependendo da quantidade relativa de solução aquosa e da característica do tensoativo, esses sistemas podem sofrer várias transformações de fases e modificações estruturais. Sendo assim, suas propriedades reológicas e consistência podem ser mudadas, se desejado. São usualmente formados por organização estrutural espontânea; dessa forma, sua produção então é relativamente simples e de baixo custo⁴.

Devido à sua estrutura nanométrica porosa e altamente uniforme, as fases de cristal líquido apresentam propriedades que favorecem a solubilização de princípios ativos nos compartimentos aquosos, oleosos ou anfílicos; além disso, eles podem ser planejados para formar uma matriz rígida carreadora de fármacos que pode ser usada para controlar a liberação dos mesmos⁵.

Dentre os materiais que podem ser empregados para obtenção de sistemas de liberação nanoestruturados precursores de cristal líquido tem-se o álcool etoxilado e propoxilado (Procetyl®AWS), oleilamina, fosfatidilcolina de soja e quitosana (QS).

O Procetyl® AWS (Figura 1A) é um tensoativo não iônico da classe dos polioxietilenos e polioxipropilenos, obtido pela reação de um álcool, de origem natural, com 20 moléculas de óxido de etileno (OE), mais 5 moléculas de óxido de propileno (OP). Com o aumento do grau de etoxilação, aumenta-se a hidrofília da molécula (maior equilíbrio hidrófilo lipófilo - EHL) alterando, conseqüentemente, sua solubilidade em água; no entanto, as moléculas de óxido de propileno têm o poder de tornar o tensoativo menos solúvel em água devido à presença de uma metila em sua molécula. O Procetyl® AWS é comumente utilizado em sistemas nanoestruturados precursores de cristal líquido⁶.

A fosfatidilcolina (Figura 1B), encontrada em plantas e células animais, é comumente isolada a partir de soja e ovos; esta molécula consiste em uma mistura de fosfolipídios naturais. Estes fosfolipídios são constituídos por uma extremidade polar formada por um grupo colina e um grupo fosfato ligados à porção hidrofóbica, duas longas cadeias acíclicas de 16 a 22 carbonos e por ligações ésteres com o glicerol. As cadeias acíclicas podem conter uma ou mais insaturações. Devido à estrutura polar-apolar (anfifílica), essas moléculas tendem a se organizar em bicamadas. Devido a essas características, esta molécula tem sido muito usada no intuito de desenvolver novos sistemas para as mais diversas áreas, em especial nas ciências farmacêuticas e biomédicas⁷.

A oleilamina (Figura 1C) é um lipídeo monocatiônico contendo uma cadeia monoleil, que em pH fisiológico encontra-se totalmente ionizada conferindo um residual positivo ao sistema⁸.

A quitosana (QS) (Figura 1 D) é um biopolímero de alta hidrofiliidade, devido ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica, permitindo sua utilização como biomaterial na forma de micropartículas, gel e membrana em diversas aplicações, como veículo de liberação de fármacos, bandagens, géis injetáveis, membranas periodontais etc. Sistemas que utilizaram QS demonstraram serem promissores para administração bucal e nasal, pois promoveram aumento significativo na bioadesão das formulações quando comparados com formulações sem este biopolímero⁹.

Devido à alta viscosidade dos cristais líquidos, estes podem promover a fixação da formulação num local de ação desejado (via nasal) após sua administração e formação *in situ*. Assim, propriedades inerentes a este sistema podem ser uma excelente estratégia para o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos¹⁰.

A via nasal tem recebido especial atenção como rota promissora para liberação sistêmica de fármacos¹¹. Seu epitélio com numerosas microvilosidades e grande área de superfície facilita a absorção de fármacos. A camada subepitelial altamente vascularizada e a membrana basal com endotélio poroso podem facilitar a permeação da molécula de interesse. Essas características podem fazer com que o fármaco seja absorvido diretamente para a circulação sistêmica, evitando metabolismo pré-sistêmico, atingindo rapidamente níveis plasmáticos terapêuticos. Todos esses fatores podem favorecer a redução da dose, a diminuição de efeitos adversos e adesão ao tratamento. Comparando-se com outras vias, a nasal tem representado um grande avanço na administração de fármacos¹².

Apesar das vantagens da via nasal, há algumas barreiras que limitam a absorção de fármacos, como o mecanismo de depuração mucociliar que pode remover a formulação da cavidade nasal.

A tuberculose (TB) acomete em sua grande maioria órgãos extremamente oxigenados como os pulmões. Sendo assim, a administração nasal de fármacos antituberculose pode ser bastante interessante, desde que se lance mão de plataformas de entrega de fármacos capazes de superar eficientemente as limitações impostas por essa via.

Atualmente o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas se dá numa velocidade muito menor ao aparecimento de mecanismos de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* (causador da tuberculose). Esse quadro dificulta muito o controle epidemiológico da tuberculose.

Um dos fármacos mais utilizados como fármaco de primeira linha no tratamento da tuberculose é a rifampicina (Figura 1 E), com efetividade de 95% nos casos de TB causados por cepas susceptíveis¹³. Porém, devido a problemas de metabolização pré-sistêmica, possíveis interações medicamentosas e níveis séricos baixos, se faz necessária a busca por alternativas para amenizar estas desvantagens.

Em suma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de sistemas líquidos cristalinos e sistemas precursores de cristal líquido mucoadesivos para a

Figura 1: Estruturas moleculares dos compostos utilizados na constituição dos sistemas formados.



5 CONCLUSÕES

Foram selecionados 6 sistemas, dentre eles sistemas líquido-cristalinos (9D, 10D, 9E e 10F) e sistemas precursores de cristal líquido (10E e 9F).

As formulações 9D, 10D, 9E e 10F demonstraram comportamentos reológicos, mecânicos e bioadesivos compatíveis com sistemas líquido cristalinos e as formulações 10E e 9F comportamentos condizentes com características de sistemas microemulsionados. Todos os sistemas quando adicionado FNS apresentaram mesofase com alto nível de organização corroborando com os resultados de mucoadesão e microscopia de luz polarizada. Foi possível também confirmar a presença de sistemas microemulsionados (10E, 10F e 10ER) com as análises de SAXS. Ainda, as análises de DSC mostraram que a rifampicina confere maior reorganização das moléculas de água, agregando estabilidade aos sistemas.

A adição do biopolímero quitosana aos sistemas 9E e 10E não mostrou aumento significativo nos parâmetros de perfil de textura (dureza, adesão, compressibilidade e coesão) e reologia quando comparados aos sistemas sem a quitosana. A incorporação do fármaco de interesse (rifampicina) nos sistemas 9D, 10D, 9E, 10E, 9F e 10F não provocou alterações nas elevadas estabilidades dos sistemas, adicionalmente observou-se aumento nos parâmetros de mucoadesão (P_{MA} e T_{MA}), quando comparado com sistemas sem rifampicina. Todos os sistemas selecionados demonstraram perfis físico-químicos compatíveis para administração nasal.

Os sistemas selecionados foram submetidos a análises citotóxicas pelo método de Difusão em Agar, onde mostraram-se moderadamente citotóxicas, com exceção do sistema 10DR que apresentou citotoxicidade branda. Após a verificação do potencial citotóxico dos sistemas, foram selecionados 2 sistemas para dar continuidade aos ensaios microbiológicos. Os sistemas 9D e 10D carreando rifampicina apresentaram atividade bactericida sobre a cepa H37rv de *Mycobacterium tuberculosis*, e ainda se mostraram potencialmente promissores na liberação de rifampicina.

Para a quantificação das amostras geradas durante o ensaio farmacocinético, um método cromatográfico totalmente miniaturizado foi desenvolvido, validado e aplicado na análise de rifampicina em plasma de rato. Esse método conta com uma etapa de extração online do analito através de acoplamento de uma coluna com

características extratoras (SPE) à uma coluna analítica, ambas capilares. Essa estratégia aumenta significativamente o dinamismo das análises, além de outras vantagens como:

- menor envolvimento do analista durante o preparo da amostra, diminuindo a possibilidade de erro;
- descarte *online* de compostos remanescentes da etapa de precipitação de proteínas, evitando sua transferência para a coluna analítica, diminuindo a possibilidade de interferências;
- volume reduzido de amostra biológica necessário para a análise, mantendo o limite de quantificação adequado para o propósito;
- consumo reduzido de solventes, reagentes e materiais utilizados; isso leva a uma redução de custo e de impacto ambiental;
- preservação da vida útil da coluna analítica com o acoplamento de uma coluna responsável pela extração e limpeza prévia da amostra.

Com o método bioanalítico desenvolvido e validado, a análise de um grande número de amostras de plasma foi possível em um período razoável de tempo, com elevado grau de confiabilidade. A análise cromatográfica de cada amostra foi realizada em 20 minutos, já considerando as etapas de lavagem e condicionamento das colunas (de extração e analítica). O volume de fase móvel utilizado para a extração e pré-concentração dos analitos foi de 2 ml; para a etapa de análise, o volume usado de fase móvel foi de 200 µl. Não foram observados efeitos de memória mesmo após a injeção de concentrações altas de rifampicina, evidenciando a eficiência do processo de lavagem da coluna de extração.

E finalmente após a quantificação dos níveis de rifampicina em plasma de rato, foi possível obter parâmetros farmacocinéticos relacionados à liberação do fármaco carregado pelos sistemas líquido cristalinos 9D e 10D. Os resultados demonstraram que os sistemas líquido cristalinos podem carrear e liberar o fármaco, promovendo uma absorção de rifampicina de 2 a 4 vezes maior por administração nasal, quando comparadas a dados da literatura para administração da mesma dose por via oral. As análises farmacocinéticas mostraram que os sistemas líquido cristalino podem ser uma plataforma viável de carregamento de rifampicina; porém isso se trata apenas de um estudo inicial, estudos futuros ainda são necessários.

Os resultados obtidos neste trabalho atingiram os objetivos propostos e mostram-se bastante promissores para obtenção de sistemas nanoestruturados que possam contribuir com alternativas para melhorar a terapia da TB. Levando em conta que o grande problema atualmente no tratamento da tuberculose é o longo período de quimioterapia (6 meses), com ingestões orais diárias dos fármacos ⁶², a possibilidade de se desenvolver um sistema nanoestruturado carreador de fármaco, garantindo liberação controlada por longos períodos, é promissora. Com isso, será possível ajustar a dose de liberação deste fármaco, favorecendo a administração do fármaco em dias alternados; consequentemente, a taxa de abandono do tratamento, que atinge grandes proporções no país, poderá sofrer importante decréscimo ⁶³.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FLOSS, H. G.; YU, T. W. Rifampicin, mode of action resistance and biosynthesis. *Chemistry. Review*, v. 105, p. 621-632, 2005.
2. MANDELL, G. L.; Petri Jr, W. A. Fármacos antimicrobianos. In: HARDMAN, J. G. et al. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana SA.1996.
3. MEHTA, J.B.; SHANTAVEERAPA, H.; BIRD, J. R. P. et al. Utility of rifampicin blood levels in the treatment and follow-up of active pulmonary tuberculosis in patients who were slow to respond to routine directly observed therapy. *Chest Journal*, v.120,p .1520-1524, 2001.
4. GURUMURTHY, P. et al. Decreased bioavailability of rifampin and other antituberculosis drugs in patients with advanced human immunodeficiencyvirus disease. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* v.48, p.4473-4475, 2004.
5. MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. *Current Drug Delivery*, v.3, p.275-285, 2006.
6. SINGH, S., Phase transitions in liquid crystals. *Physics Reports*, v.324, p.107-269, 2000.
7. BRUSCHI et al., 2008). BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O.; LARA, E. H.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P.; JONES, D. S. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: development and characterization. *DrugDevelopment Industrial Pharmacy*, v. 34, n. 3, p. 267-278, 2008.
8. SHAH J.C.; SADHALE Y.; CHILUKURI D.M. Cubic phase gels as drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 47, 229-250, 2001.
9. MAKAI M.; CSÁNYI E.; NÉMENTH Z.; PÁLINKÁS J. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol, *International Journal of Pharmaceutics*. v.256, p.95-107, 2003.
10. VENUGOPAL, J. et al. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. *Current Pharmaceutical Design* , v.15, n.15, p.1799-1808, 2009.
11. UGWOKKE, M. I.; AGU, R. U.; VERBEKE, N.; KINGET, R. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1640-1665, 2005.

12. THORNE, R.G. et al. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and sinal cord along olfactory and trigeminal pathway following intranasal administration. *Neuroscience*, v.127, p.481-96, 2004.
13. AHMED, M.; RAMADAN, W.; RAMBHU, D.; SHAKEEL, F. Potential of nanoemulsions for intravenous delivery of rifampicin. *Pharmazie*, v.63, p. 806–811, 2008.
14. CALLENS, C. et al. Rheological study on mucoadhesivity of some nasal powder formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.55, p.323-328, 2003.
15. LAHOUD, M.H., CAMPOS, R. Aspectos teóricos relacionados a reologia farmacêutica. *Visão acadêmica*, v.11, n.1, p. 65-73, 2010.
16. CARVALHO, F. C. et al. Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.62, p.439-439, 2010.
17. WILLERSHAUSEN, B. et al. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *Journal Endodontic*, v.26, n. 12, p. 703-7,. 2000.
18. López-Gavín, A. et al. In vitro time–kill curves study of three antituberculous combinations against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 47, p. 97- 100, 2016.
19. ANVISA, Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 14 jun. 2018.
20. ANVISA, Resolução nº 27, de 27 de maio de 2012. **Guia para validação de métodos analíticos**. Agência nacional de vigilância sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.org.br>>. Acesso em: 14 jun. 2018.
21. HUANG, L., LIU, J.; YU, X.; SHI, L.; LIU, J.; SHIAO, H.; HUANG, Y. Drug-drug interactions between moxifloxacin and rifampicin based on pharmacokinetics in vivo in rats. *Biomedical Chromatography*, v. 30, p. 1591-1598, 2016.
22. CHOW, S. C.; LIU, J. P., Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies. Nova Yorque: Marcel Dekker, 2000.
23. PAIVA F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Salvador: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz. 2005. Disponível em: http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostila_manipula%C3%A7%C3%A3o.pdf. Acesso em 20 de junho de 2018.

24. KAMO, T., HANDA, T., NAKANO, M. Lateral pressure change on phase transitions of phosphatidylcholine/diolein mixed membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.104, p.128-132, 2013.
25. TSE-VE-KOON, K., TREMBLAY, N., CONSTANTIN, D., FREYSSINGEAS, E. Structure, thermodynamics and dynamics of the isotropic phase of spherical non-ionic surfactant micelles. *Journal of Colloids and Interface Science*, v.393, p.161-173, 2013.
26. ZABARA, A., MEZZENGA, R. Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases. *Journal of Controlled Release*, v. 188, p. 31-43, 2014.
27. FLORENCE, A. T., ATTWOOD, D. *Princípios físicos químicos em farmácia*. São Paulo: Edusp, 2003. 732p.
28. LAWRENCE, J. P. F.; SCALIA, G. A new era for liquid crystal research: Applications of liquid crystals in soft matter nano-bio-and microtechnology. *Current Applied Physics*, v.12, p.1387-1412, 2012.
29. SHI, C., ZHU, Y., RAN, X. et al. 2006, Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical Research*, v. 133, pp. 185-192.
30. FORMARIZ, T. P., *Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, v.41, n.3, p. 301-313, 2005.
31. CARVALHO, F. C. et al. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.84, n.1, p.219-227, 2013.
32. CHORILLI, M. 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.158-167.
33. DELI, M., A. Potential use of tight junction modulators to reversibly open barriers and improve drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1788, p.892-910, 2009.
34. RAVINDRA, V. et al. Microwave Assisted Facile Syntesis of a New Tri-block Chitosan Conjugate with Improved Mucoadesion. *Carbohydrate Polymers*, v. 130, p. 213-221, 2015.
35. MENCHICCHI, B. et al. Structure of Chitosan Determines its Interactions with Mucin. *Biomacromolecules*, v.15, p.3550-3558, 2014.
36. STUREGARD, E. et al. Little difference between minimum inhibitory concentrations of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type organisms determined

- with BACTEC MGIT 960 and Middlebrook 7H10. *Clinical Microbiology and Infection*, v.21, p.148.e5-148.e7, 2015.
37. JONES, D. S. et al. Rheological characterization of bioadhesive, antimicrobial, semisolids designed for the treatment of periodontal disease: transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.90, p.1978-1990, 2001.
 38. SHARVIL, S. P. et al. Liquid Crystalline Phase as a Probe for Crystal Engineering of Lactose: Carrier for Pulmonary Drug Delivery. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 68, p. 43-50, 2015.
 39. SAVIC, et al. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion system: The influence of colloidal structure on emulsions skin. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.358, p.182-191, 2011.
 40. ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada*, v.29, n.1, p.81-96, 2008.
 41. FRESNO, M. J. et al. Systematic study of the flow behaviour and mechanical properties of Carbopol® Ultrez™ 10 hydroalcoholic gels. *European Journal of Pharmaceutics*, v.54, p.329-335, 2002.
 42. Longo, D. P. Obtenção, caracterização e estudos de liberação in vitro e permeação in vivo de sistemas microestruturados contendo cafeína. 2006. 139f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2006.
 43. CHORILLI, M. Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmiato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo. 2007. 172f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.
 44. FORMARIZ, T.P. et al. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and their relationship with doxorubicin release. *Colloids Surf B Biointerfaces*.v. 63, p.287-95, 2008.
 45. PENZERS, T. Rheological analysis of the structural properties affecting the percutaneous absorption and stability in pharmaceutical organogels. *Rheology Acta*, v.43, p.457-463, 2004.
 46. 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 Biologic Macromolecules*, v. 48, p. 263–270, 2011.

47. 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, p.280-28, 2012.
48. BEAUCAGE, G. *et al.* Multiple size scale structures in silica-siloxane composites studied by small-angle scattering. *American Chemical Society Symposia Proceedings*, v. 585, p. 97-111, 1995.
49. HOLMQVIST, P. *et al.* Modification of the Microstructure in Poloxamer Block Copolymer-Water-Oil Systems by Varying the Oil Type. *Macromolecules*. v. 30, p. 6788-6797, 1997.
50. YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. *In vitro* permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 78, p. 185–192, 2010.
51. FERNANDES, F. H. A. *et al.* Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 113, n. 2, p. 443-447, 2013.
52. HIGUCHI, A.; IJIMA, T. D.s.c. investigation of the states of water in poly(vinyl alcohol) membranes. *Polymer*, v. 26, n. 8, p. 1207-1211, 1985.
53. DEVIREDDY, R. V.; RAHA, D.; BISCHOF, J. C. Measurement of water transport during freezing in cell suspensions using a differential scanning calorimeter. *Cryobiology*, v. 36, n. 2, p. 124-55, 1998.
54. ROGERO, S. O. *et al.* Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v. 6, n. 3, p. 317-20, 2003.
55. CRUZ, A. S. *et al.* Comparison of methods to test an "in vitro" test of cytotoxicity of biocompatible hospital materials. *Rev Saúde Pública*, v. 32, n.2, p.153-9, 1998.
56. OSORIO, R. M. *et al.* Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal Endontic*, v. 24, n. 2, p.91-6, 1998.
57. LOPES, L. B., Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídicos: avaliação *in vitro* e *in vivo* de sistemas de liberação e moléculas carreadoras. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, 2005.
58. FARKAS, E.; KISS, D.; ZELKÓ, R. Study on the release of chlorhexidine base and salts from different liquid crystalline structures. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 340, n. 1–2, p. 71-75, 2007.
59. OYAFUSO, M. H.; CARVALHO, F. C.; CHIAVACCI, L. A.; GREMIÃO, M. P. D.; CHORILLI, M. Design and Characterization of Silicone and Surfactant Based

Systems for Topical Drug Delivery. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 15, n. 1, p. 817-826, 2015.

60. ALLONSON, A. L.; COTTON, M. M.; TETTEY, J. N. A.; BOYTER, A.C. Determination of rifampicin in human plasma and blood spot by high performance liquid chromatography with UV detection: A potential method for therapeutic drug monitoring. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 44, p. 963-969, 2007.
61. GHICIUC, C. M.; RADUCANU, N.; LENARD, F.; VLASE, L.; LUPUSORU, C. E.; IRCIOIU, C.; TILEA, B. Rapid simultaneous LC/MS² determination of rifampicin and 25-desacetyl rifampicin in human plasma for therapeutic drug monitoring. Studia UBB Chemia, v. 2, p. 309-320, 2015.
62. BLANCHARD, J.S. (1996). Molecular Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Annual Review of Biochemistry 65, 215-221.
63. CENTERS OF DISEASES CONTROL. Primary mult-drug-resistant tuberculosis- Ivanovo Oblast, Morb. Mortal Weekly Rep.v. 48,p. 661-663, 1999.