



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

GIOVANA MARIA FIORAMONTI CALIXTO

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

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

ARARAQUARA - SP

2017

GIOVANA MARIA FIORAMONTI CALIXTO

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

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

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

ARARAQUARA - SP

2017

Ficha Catalográfica

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

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

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

Orientador: Marlus Chorilli.

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

CAPES: 40500005

GIOVANA MARIA FIORAMONTI CALIXTO

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

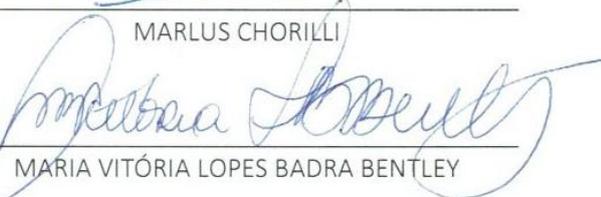
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 27 de janeiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



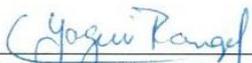
MARLUS CHORILLI



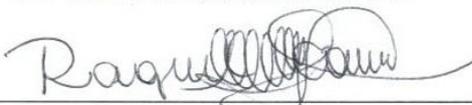
MÁRIA VITÓRIA LOPES BADRA BENTLEY



RENATA FONSECA VIANNA LOPEZ



CARLOTA DE OLIVEIRA RANGEL YAGUI



RAQUEL MANTUANELI SCAREL CAMINAGA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer Bucal

O carcinoma epidermóide oral é o sexto câncer mais comum em ambos os sexos em todo o mundo. É também considerada a neoplasia maligna mais comum da cabeça e pescoço, e a maior parte dos pacientes vem a óbito por volta de cinco anos após seu diagnóstico, estabelecendo-se assim como um sério de problema de saúde pública (SANKARANARAYANAN *et al.*, 2017).

No Brasil, segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), ocorreram 5.401 mortes decorrentes deste câncer em 2013, sendo 4.223 homens e 1.178 mulheres e estimou-se 15.490 novos casos para o ano de 2016, sendo 11.140 em homens e 4.350 em mulheres.

Historicamente, a taxa de mortalidade associada a este câncer é particularmente alta por ser diagnosticado tardiamente, já que não há programas sociais abrangentes para educar a população a identificar a doença em sua fase inicial (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Outro obstáculo à descoberta precoce é o advento do vírus papiloma humano HPV16, que contribui muito para o aumento da taxa de incidência de cânceres orais, particularmente na parte posterior da boca (orofaringe, amígdalas e base da língua). Esse fato é preocupante porque muitas vezes neste câncer não há a produção de lesões visíveis ou descolorações, que são os primeiros sinais de alerta do processo da doença. Assim, o câncer bucal só é descoberto quando ocorre metástase para os gânglios linfáticos do pescoço. O prognóstico nesta fase da descoberta é significativamente pior do que quando é detectado numa área intra-oral localizada (LEITE *et al.*, 2005)

Outro fator de risco para o câncer bucal é a idade, pois frequentemente ocorre em pessoas com mais de 40 anos. A idade dos pacientes diagnosticados pode indicar um componente temporal nos processos bioquímicos ou biofísicos de envelhecimento celular que permite a sua transformação em células malignas. Além disso, a eficácia do sistema imunológico diminui com a idade. O uso do tabaco e o consumo de álcool também são importantes fatores de risco. As pessoas que fumam e bebem têm um risco 15 vezes maior de desenvolver câncer bucal do que os que não fumam nem bebem. Além destes fatores supracitados, há fatores físicos como a exposição à radiação ultravioleta. Este é um agente causador em câncer do lábio, bem como outros cânceres de pele. Outro fator físico é a exposição aos raios-X, pois a radiação é acumulada ao longo da vida, o que pode implicar no surgimento de câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SARAIVA *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 1997).

O diagnóstico do câncer bucal é muito complicado porque é um câncer indolor e provoca discretas alterações na boca. Os principais sinais que devem ser observados são lesões na cavidade oral ou nos lábios que não cicatrizam por mais de 15 dias, manchas vermelhas ou esbranquiçadas na língua, gengivas, palato (céu da boca), mucosa jugal, nódulos no pescoço e rouquidão persistente. Nos casos mais avançados, observa-se dificuldade de mastigação e de engolir, dificuldade na fala e sensação de que há algo preso na garganta (FERREIRA *et al.*, 2016).

A confirmação diagnóstica definitiva é possível por biópsia e por análise histopatológica com possível evidência citológica, e devem ser evitadas pesquisas diagnósticas demoradas e dispendiosas que apenas atrasem o início do tratamento e, conseqüentemente, diminuam a taxa de sobrevivência dos pacientes (FELIPPU *et al.*, 2016).

Após um diagnóstico definitivo, o tratamento é multidisciplinar envolvendo cirurgiões, oncologistas de radiação, oncologistas de quimioterapia, dentistas, nutricionistas e especialistas em reabilitação e restauração. As modalidades de tratamento são quimioterapia com radiação concorrente, às vezes combinada com a cirurgia (O'NEILL *et al.*, 2002).

No entanto, a baixa solubilidade em água, baixa permeabilidade e baixa biodisponibilidade dos fármacos são limitações cruciais para quimioterapia oral (AGUEROS *et al.*, 2009; GOKCE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014).

Para aumentar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos colaterais, a incorporação desses quimioterápicos em sistemas de liberação de fármacos, tais como cristais líquidos representa uma opção interessante para a veiculação desta classe de fármacos.

2.2 Metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos do câncer bucal

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são um grupo de enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais, incluindo o colágeno intersticial, a fibronectina, a laminina e a proteoglicana (SOUZA *et al.*, 2002).

A descoberta das MMPs ocorreu no ano de 1962, quando Gross e Lapière encontraram uma enzima ativa na cultura de fragmentos da pele de ratos, a qual degradou a tripla hélice do colágeno tipo I maduro (PETERSON *et al.*, 2004).

Atualmente, mais de 20 tipos diferentes de MMPs humanas foram identificados, as quais são classificadas em 5 grandes grupos de acordo com a especificidade do substrato e a sua homologia interna: colagenases, gelatinases, estromelisinases, tipo-membrana e matrilisina (NAVARRO *et al.*, 2006).

As MMPs são secretadas na forma de pró-enzimas inativas, denominadas zimogênios, que são ativadas no ambiente pericelular dos tecidos por uma segmentação dos zimogênes denominada propeptídeo, ou seja, por quebra de uma ligação de cisteína Zn^{++} que bloqueia a reatividade do local ativo. Os leucócitos polimorfonucleares, os queratinócitos, os monócitos, os macrófagos, os fibroblastos e as células mesenquimais são as principais células que produzem as MMPs. Na presença de fatores de crescimento e citocinas, incluindo a interleucina 1 (IL-1), TNF- α e TGF- α , elas liberam as MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular. Todas as MMPs contêm íons Zn^{++} no sítio de ação catalítica e requerem íons Ca^{++} para sua estabilidade e atividade, sendo, por isso, denominadas enzimas metal dependentes (NAGASE *et al.*, 1996).

Segundo Birkedal-Hansen (2000), a atividade das MMPs no substrato da matriz extracelular é regulada por quatro vias: 1) por regulação na transcrição nos genes das MMPs; 2) por ativação de precursores; 3) por diferenças de especificidade de substrato; e 4) por inibidores de MMPs (KETSAWATSOMKRON *et al.*, 2016).

Os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) são proteínas pequenas e multifuncionais que regulam as funções das MMPs, o nível de sua ativação e sua habilidade de hidrolisar um determinado substrato. O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular (SINEVICI *et al.*, 2016).

É conhecido que um processo patológico da matriz extracelular pode se instalar quando houver excesso de atividade das MMPs nos tecidos. Estudos recentes indicaram que as MMPs estão envolvidas na gênese inicial de tumores, na modulação da proliferação, na apoptose e na angiogênese. Por exemplo, durante a metástase, as células tumorais produzem MMPs para degradar os tecidos vizinhos, invadindo o estroma local e ultrapassando a membrana basal de um vaso sanguíneo. Um estudo verificou que as MMPs presentes no ameloblastoma podem desempenhar papel importante no processo de invasão local dessa neoplasia (CURRAN *et al.*, 1999).

Lin *et al.* (2004) verificaram que um polimorfismo genético na região promotora do gene de MMPs é um fator de susceptibilidade para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas orais.

Impola *et al.* (2003) mostraram que a ausência de expressão de proteínas MMP-7, -9 e -12 a partir de células epiteliais pode servir como um bom marcador prognóstico de carcinoma oral não invasivo. O bloqueio da atividade de MMPs ou integrinas específicas relacionadas à invasão tecidual pode oferecer novas modalidades terapêuticas para o carcinoma oral em fase precoce.

Birkedal-Hansen *et al.* (2000) concluíram que os transcritos específicos de MMP (MMP-3, -7, -10, -14) e TIMP-3 observados em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço comparados com a sua frequência em tecidos saudáveis correspondentes fornecem informações importantes sobre a expressão de MMPs e dos seus inibidores em carcinomas de cabeça e pescoço.

Portanto, o desenvolvimento de inibidores sintéticos de MMP para a intervenção terapêutica no câncer bucal é muito interessante. Assim, em 1999, KOIVUNEN *et al.* descreveram o isolamento de peptídeos inibidores de gelatinase específicos a partir de bibliotecas de peptídeos de exibição de fagos. Os autores mostraram que os peptídeos cíclicos contendo a sequência HWGF são inibidores potentes e seletivos de MMP-2 e MMP-9, sendo que o protótipo peptídeo sintético, CTTHWGFTLC, conseguiu inibir a migração de células endoteliais humanas e células tumorais. Além disso, preveniu o crescimento e a invasão de tumores em modelos animais e melhorou a sobrevivência de ratos portadores de tumores humanos. Finalmente, mostraram que o fago que exhibe CTTHWGFTLC direciona-se especificamente para vasos sanguíneos *in vivo*.

Portanto, os inibidores seletivos da gelatinases podem revelar-se úteis em terapias de antitumorais.

2.3 Terapia Fotodinâmica

Os corantes são caracterizados pela sua habilidade de absorver luz visível com elevada eficiência em alguma região do espectro visível, portanto alguns desses compostos são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas (DA HORA MACHADO *et al.*, 2000).

Por esse fato, desde o início do século, tem-se discutido o emprego de corantes como fármacos. Raab, em 1900, observou a morte de protozoários quando expostos à luz solar e ao ar, na presença do corante acridina. Finsen, em 1901, relatou que a tuberculose luposa poderia ser tratada com a radiação solar e em 1903, ele ganhou o prêmio Nobel de Medicina. No mesmo ano, Trappeiner combinou a aplicação tópica do corante eosina e da luz para o tratamento de câncer de pele. Em 1913, Meyer-Betz autoinjetou hematoporfirina e ao se expor à luz teve fotossensibilidade na pele. Em 1925, Policard estudou porfirinas para investigar seus possíveis efeitos fototóxicos no organismo, principalmente em tumores malignos (SIMPLICIO *et al.*, 2002; KONAN *et al.*, 2002, ALISSON *et al.*, 2008).

A partir 1950, Schwartz & Lipson purificaram a hematoporfirina e relataram que esse fármaco se acumulava preferencialmente em tumores implantados em camundongos e que

após a incidência de luz sobre o tumor, ocorria a regressão da doença (SIMPLICIO *et al.*, 2002; KONAN *et al.*, 2002, ALISSON *et al.*, 2008).

No final da década de 60, Lipson relatou o tratamento do câncer de mama administrando hematoporfirina e luz, iniciando-se assim o uso da terapia fotodinâmica (TFD) para o tratamento clínico do câncer (SIMPLICIO *et al.*, 2002; KONAN *et al.*, 2002, ALISSON *et al.*, 2008).

Assim, em 1994, o governo japonês autorizou o emprego do fotossensibilizador (FS) Photofrin na terapia de câncer de pulmão, o qual foi aprovado nos Estados Unidos da América em 1996 e na França em 1997. Nesses países, diversos procedimentos clínicos têm sido estabelecidos, sendo que alguns deles já vêm tendo o seu emprego autorizado, em virtude dos estímulos concedidos à pesquisa neste campo (SPERANDIO *et al.*, 2009).

O princípio da TFD é a interação de luz com um fármaco fotossensibilizador (FS) e oxigênio resultando em espécies reativas capazes de inviabilizar as células. Essa interação de luz ocorre por dois mecanismos nomeados “mecanismo tipo I” e “mecanismo tipo II”, ilustrados na Figura 1 (LIM *et al.*, 2012).

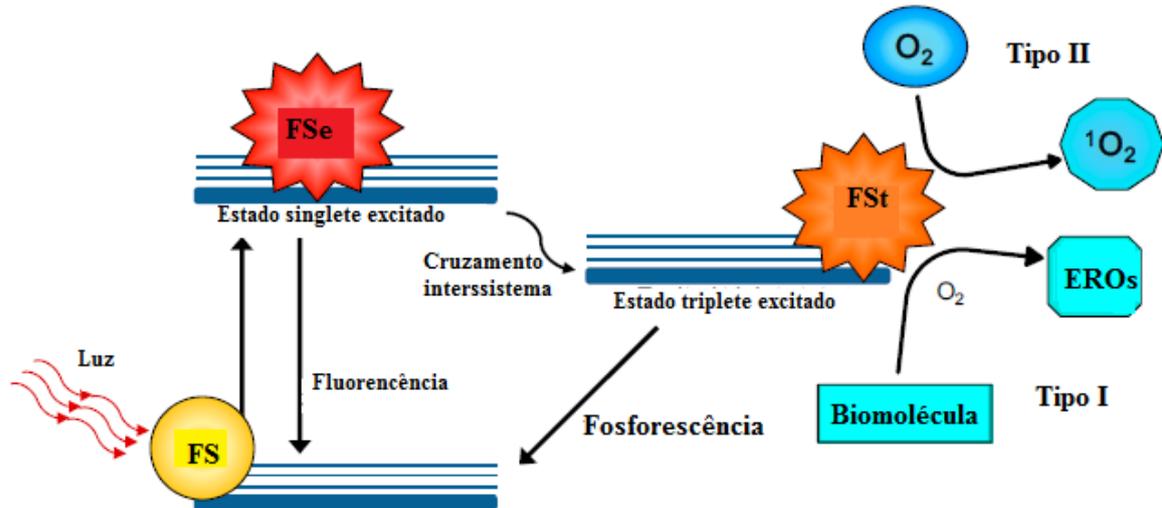


Figura 1. Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica (Adaptado de CALIXTO *et al.*, 2016). Após a absorção de luz, o fotossensibilizador (FS) alcança o estado singlete excitado e após o cruzamento intersistema, ele alcança o estado triplete excitado que interage diretamente com biomoléculas, produzindo radicais ou íons radicais através de reações de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons que reagem instantaneamente com o O₂, gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (EROS), os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas. No mecanismo tipo II, obtém-se oxigênio singlete altamente reativo através da transferência de energia do FS no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio.

No mecanismo tipo I ocorre a transferência de elétron entre o fotossensibilizador no estado triplete excitado e biomoléculas, gerando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados. No mecanismo tipo II ocorre transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete, com a geração de oxigênio singlete, um agente altamente citotóxico. Em sistemas biológicos, o oxigênio singlete apresenta tempos de vida extremamente baixos, inferiores a 0,04 μ s. Assim, a TFD atinge somente os substratos biológicos que estão próximos à região onde essas espécies são geradas dentro de um raio de 20 nanômetros, aproximadamente. Portanto, a localização do FS é um fator importante nos estudos de TFD, para que ocorra a seletividade pelo tecido tumoral (LIM *et al.*, 2012).

Dessa forma, a escolha do FS é fundamental para o sucesso do tratamento com a TFD. O FS deve ser preferencialmente excitado pela luz de um comprimento de onda na janela terapêutica (600-700 nm), que tem maior capacidade de penetração no tecido e não deve ser tóxico para as células na ausência de luz. Por último, deve ser capaz de induzir morte celular imunogênica que é caracterizada por alterações na composição da superfície celular para liberar os mediadores solúveis que ativam células dendríticas e T, promovendo o desenvolvimento de uma resposta imunitária específica contra tumores malignos (ALLISON *et al.*, 2013).

Um dos FS que apresenta essas características é o azul de metileno (AM), que é um corante orgânico com propriedades fluorescentes e fotossensibilizantes, que inativa efetivamente vírus e bactérias além de ser tóxico às células malignas. Essa ação ocorre pelo fato do AM possuir carga positiva e baixo peso molecular, o que promove uma maior interação com as células de mamíferos, tornando-o uma opção atraente para TFD de câncer. Além disso, o equilíbrio hidrófilo/lipofílico e a carga positiva do AM permitem sua fácil penetração na membrana biológica (CHEN *et al.*, 2007).

O AM também é interessante por causa de seu menor custo e disponibilidade mais fácil em comparação com outros FS. O uso do AM no tratamento do câncer tem mostrado resultados promissores como evidenciado por vários estudos, dentre eles DE FREITAS *et al.*, 2015, TARDIVO *et al.*, 2005, WAGNER *et al.*, 2013 e SAMY *et al.*, 2014.

No entanto, embora o AM apresente solubilidade elevada em água, suas soluções são rapidamente eliminadas após sua administração intravenosa devido formação de leucoAM, que não apresenta ação fotossensibilizante. Portanto, a proteção do AM para evitar a sua transformação em leucoAM é essencial (SCHAFER *et al.*, 2013).

Dessa forma, a utilização de nanotecnologia representa uma abordagem emergente para melhorar o resultado da TFD do câncer. O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos baseados na nanotecnologia, como os sistemas líquidos cristalinos, pode facilitar a distribuição intracelular precisa de FS.

2.4 Sistemas líquidos cristalinos

Os cristais líquidos (CLs) são conhecidos desde 1889, quando Lehman descreveu um estado intermediário na transformação térmica de sólido para líquido. Em 1922, Friedel usou o termo estado mesomórfico para definir este quarto estado da matéria; dessa forma, os CLs passaram a ser denominados como fases mesomórficas ou mesofases cristalinas (FRANK *et al.*, 1958; EMSLEY *et al.*, 2013).

Os CLs liotrópicos são formados pela mistura de uma molécula anfifílica (tensoativo) e solventes, como óleos e água, que dependendo de sua temperatura e concentração podem se organizar em mesofases do tipo lamelar, hexagonal ou cúbica (PATEL & PATEL, 2010), conforme mostrado na Figura 2.

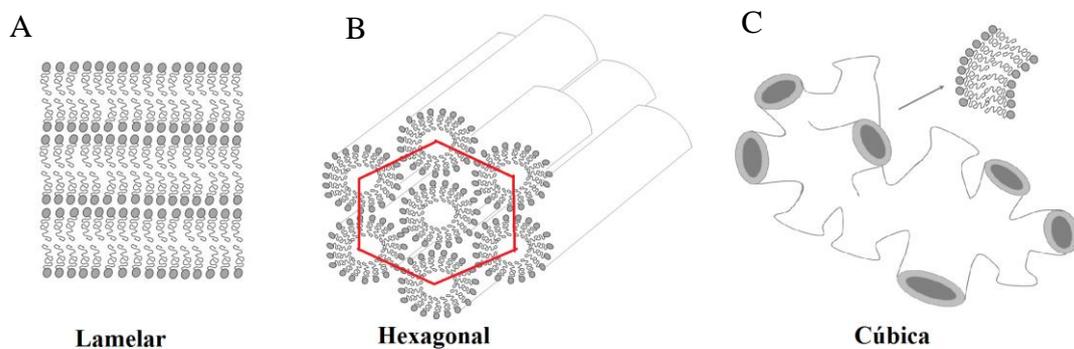


Figura 2. Representações esquemáticas de fases líquidos cristalinas formadas por compostos anfifílicos em água, sendo lamelar (A), hexagonal (B) e cúbica (C). Adaptado de CALIXTO *et al.*, 2015.

A mesofase lamelar apresenta baixa viscosidade e é formada por bicamadas de tensoativo separadas por água que, ao serem observadas pelo microscópio de luz polarizada (MLP), apresentam estruturas em forma de cruz de malta. A mesofase hexagonal apresenta viscosidade intermediária e é formada por agregados lipídicos cilíndricos num meio contínuo de água formando estruturas hexagonais (como observado pelo hexágono vermelho na Figura 2.B) que ao serem observadas pelo microscópio de luz polarizada apresenta estruturas

estriadas. A mesofase cúbica apresenta alta viscosidade e é formada por micelas normais ou reversas justamente empacotadas em simetria cúbica e apresentam um campo escuro ao serem observadas pelo MLP (MALMSTEN, 2002, FLORENCE & ATTWOOD, 2006).

Quando há apenas um tensoativo no sistema, a formação dessas diferentes mesofases pode se basear no conceito do parâmetro de empacotamento crítico (PEC), que é um valor geométrico da relação entre o volume da cauda hidrofóbica (v), o volume da área de cabeça polar (A) e o comprimento da cauda hidrofóbica (l), ou seja, $PEC = v / A \cdot l$. Dessa forma, há a formação de mesofase lamelar se o valor de PEC for igual 1; se o valor de PEC for menor que 1, ocorre a formação de mesofases hexagonais e de micelas normais. E se o valor de PEC for maior que 1, ocorre a formação de mesofases cúbicas, mesofases hexagonais e micelas reversas. Assim, pode-se prever aproximadamente a ordem de transição de tensoativos associados com a mudança na curvatura da água ou óleo na interface (ISRAELACHVILI *et al.*, 1976; ISRAELACHVILI, 1991; SAGALOWICZ *et al.*, 2006).

A adição de co-tensoativos, sais ou outros componentes, como polímeros, pode influenciar a formação das diferentes mesofases pelas interações eletrostáticas ou ligações químicas como força de van de Waals ou pontes de hidrogênios entre esses componentes (NAKANO *et al.*, 2002; YAGHMUR *et al.*, 2004; YAGHMUR *et al.*, 2009).

Na área de TFD utilizando sistemas líquidos cristalinos, LOPES *et al.* (2006) investigaram nanopartículas de cristais líquidos liotrópicos carregadas com um derivado de clorina, um FS usado para TFD de câncer de pele. Os autores prepararam uma nanodispersão da fase hexagonal misturando monooleína, ácido oleico, poloxamer e água e concluíram que essa nanodispersão mostrou potencial para a entrega do FS na pele, que é a condição crucial para sucesso da PDT tópico.

Rossetti *et al.* (2016) desenvolveram nanodispersões de fases cristalinas líquidas (NLPs), compostas de monooleína e ácido oleico para melhorar a retenção tópica do fotossensibilizador protoporfirina IX (PpIX) e concluíram que essa formulação otimiza a terapia fotodinâmica usando este fotossensibilizador.

Na área de terapia anticâncer, ZENG *et al.* (2012) desenvolveram nanopartículas líquidas cristalinas constituídas de fosfatidilcolina de soja e dioleato de glicerol para a incorporação de paclitaxel e concluíram que estes sistemas demonstraram potencial como nanocarreadores para fármacos insolúveis em água tais como paclitaxel, melhorando a sua biodisponibilidade intravenosa.

Os SLCs também são estratégias interessantes para a administração de fármacos por via bucal, pois o principal desafio para o sucesso da liberação bucal é o tempo de residência

da forma farmacêutica no ambiente bucal, para permitir que os fármacos possam atuar no local de aplicação, ou serem absorvidos através da mucosa. No entanto, o cisalhamento no ambiente bucal promovido pelos movimentos de ingestão de alimentos, mastigação, fala, além do fluxo de saliva, podem impedir que as formulações sejam aderidas à mucosa bucal, levando a uma redução ou nenhuma eficácia (PATEL *et al.*, 2011).

Assim, estudos do nosso grupo de pesquisa vêm mostrando que os SLC acrescidos de polímeros podem atuar como sistemas bioadesivos além de promover o aumento da permeação e retenção do fármaco pela superfície biológica (CALIXTO, 2013; BERNEGOSSI, 2014; FONSECA-SANTOS, 2015; SALMAZI *et al.*, 2015; CALIXTO *et al.*, 2016; BERNEGOSSI *et al.*, 2016; CINTRA *et al.*, 2016).

Tendo em vista as vantagens que os SLC podem oferecer no desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos e os resultados promissores obtidos por nosso grupo de pesquisa em relação ao tensoativo Procetyl[®] com adição de polímeros bioadesivos, este trabalho tem como objetivo explorar estas plataformas tecnológicas para o desenvolvimento de um sistema de liberação nanoestruturado mucoadesivo para a administração bucal de fármacos.

3 OBJETIVO

Desenvolver sistemas precursores de cristais líquidos mucoadesivos para administração bucal do peptídeo antigelatinolítico CTT1, bem como avaliar o emprego da terapia fotodinâmica utilizando o azul de metileno como fotossensibilizante, na terapia contra o câncer bucal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas, reagentes e soluções

- Ácido acético glacial – Qhemis;
- Ácido oleico P.A. – Synth;
- Água deionizada em sistema Milli Q com condutividade $18,2\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$;
- Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP- Procetyl AWS – Croda;
- Azul de metileno – Sigma-Aldrich;
- Polietilenoimina baixa peso molecular isento de água – Sigma-Aldrich;
- Quitosana de baixo peso molecular – Sigma-Aldrich;
- Trietanolamina – Synth;
- DMEM - Sigma Co;
- Ham's F12 - Sigma Co;
- Soro fetal bovino – Cultlab;
- MTT-{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} - Sigma Co;
- Tripsina EDTA 0,05% - Gibco
- Peptídeo CTT1 (95 % de pureza) – Aminotech Pesquisa e Desenvolvimento.
- Oncileg[®]-A pasta oral (gelatina, pectina cítrica, carmelose sódica, polietileno, petrolato líquido) constituída por 1% de triancinolona acetona) - Legrand Pharma Indústria Farmacêutica Ltda

4.1.2 Equipamentos

- Analisador de textura TA.XT Plus – Stable Micro Systems[®];
- Agitador mecânico – Marconi[®];
- Balança analítica – Owa labor[®];
- Balança semianalítica – Gehaka[®];
- Centrífuga de tubos TC6 – Sorvall TC[®];

- Espectrofotômetro UV Carry 60 - Agilent Technologies;
- Lavadora Ultrassônica - Unique[®];
- Microscópio de luz polarizada Olympus BX41 com Câmara acoplada QColor3 Olympus America INC;
- Peagômetro – Gehaka[®];
- Reômetro, modelo AR2000 – TA Instruments[®];
- Sistema de purificação de água MILLIPORE[®], Milli - Q Plus.
- Termômetro infravermelho - MT-350;

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação da dispersão de quitosana 5% (m/m)

Pesaram-se 5 gramas de quitosana (QS), as quais foram suspensas em 95 gramas de solução de ácido acético 8,75% (m/m) com agitação mecânica a 150 rotações por minuto (rpm) por 24 horas (CALVO *et al.*, 1997).

4.2.2 Preparação da solução de polietilenoimina 5% (m/m)

Pesaram-se 5 gramas de polietilenoimina (PEI), as quais foram misturadas com 95 gramas de água com agitação manual (WANG *et al.*, 2006).

4.2.3 Preparação da solução de polietilenoimina a 2,5% (m/m) e quitosana a 2,5% (m/m).

Pesaram-se 2,5 gramas de polietilenoimina e 2,5g de quitosana. PEI e QS foram misturadas por agitação mecânica com 95g de solução de ácido acético a 4,38% por 24 horas a 150 rpm.

4.2.4 Construção dos diagramas de fases

Foram construídos quatro diferentes diagramas de fases, fixando-se, em todos, ácido oleico como fase oleosa e álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP (Procetyl[®] AWS) como tensoativo. Foram utilizadas quatro diferentes fases aquosas, dentre os quais água (Diagrama 1), dispersão de quitosana 0,5% (Diagrama 2), dispersão de polietilenoimina

0,5% (Diagrama 3) e dispersão binária de polietilenoimina 0,25% e quitosana 0,25% (Diagrama 4).

À $25 \pm 0,5$ °C, 54 diferentes proporções variando em 10% em 10 % (m/m) cada fase dos sistemas foram misturadas com agitação em vórtex resultando, desse modo, na construção do diagrama de fase com 54 pontos como ilustrado na Figura 3.

O ponto 31 destacado na Figura 3 exemplifica a direção do vértice utilizada para cada ponto do sistema, sendo assim esse ponto apresenta 30 % de fase aquosa, 30% de fase oleosa e 40% de tensoativo.

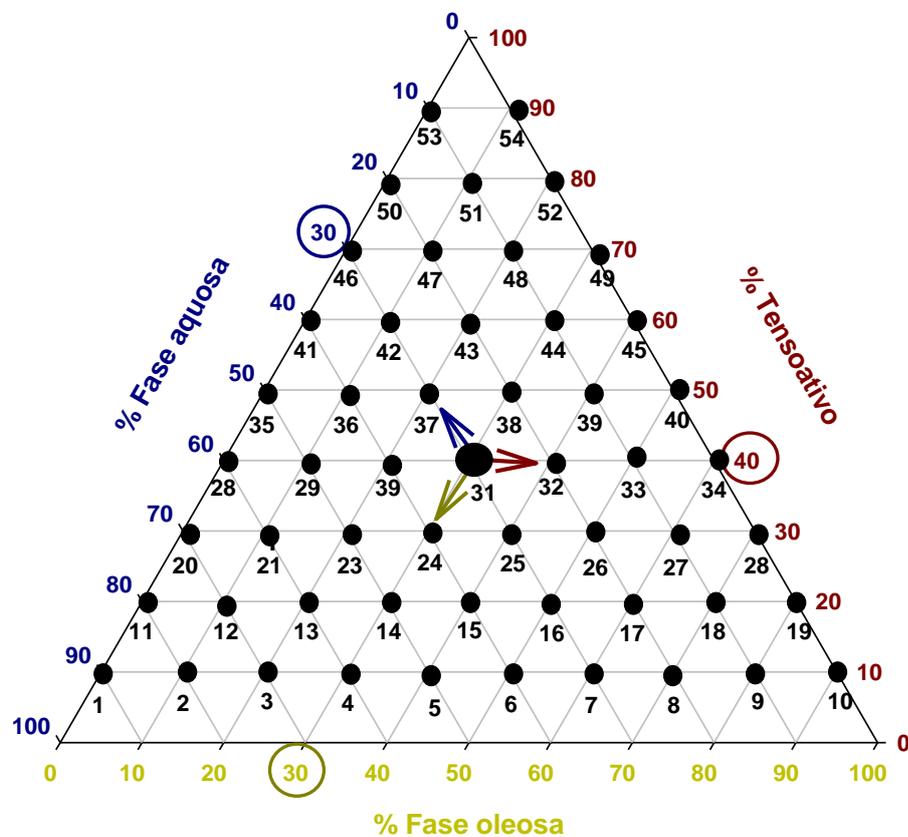


Figura 3. Exemplo do diagrama de fase com 54 pontos. O ponto 31 destacado apresenta 30 % de fase aquosa, 30% de fase oleosa e 40% de tensoativo.

Para os sistemas ternários com dispersão polimérica como fase aquosa, inicialmente, foram misturados 10% da dispersão polimérica a 5% com diferentes quantidades de água, de modo que resultasse numa porcentagem polimérica final nos sistemas de 0,5%.

Os sistemas foram deixados em repouso por 48 horas até a completa estabilização e eliminação de bolhas. Após esse período, foram classificados visualmente como sistema

líquido transparente (SLT), sistema viscoso transparente (SVT), sistema opaco (SO) e separação de fases (SF). Os diagramas de fases foram plotados no programa SigmaPlot[®], versão 10.0 (Systat Software, EUA).

4.2.5 Microscopia de luz polarizada (MLP) e seleção dos sistemas precursores de cristal líquido (SPCL)

4.2.5.1 Análise de Reprodutibilidade para Calibração do Pesquisador

Foram analisadas 20 diferentes fotomicrografias de sistemas líquidos cristalinos obtidos por MLP em duas ocasiões diferentes.

4.2.5.2 Microscopia de luz polarizada

Após a classificação visual, os sistemas classificados como SLT e SVT foram analisados por MLP. Para isso, uma pequena alíquota dos sistemas selecionados foi colocada em uma lâmina, a qual foi coberta com lamínula e em seguida analisada em microscópio de luz polarizada. Foram utilizadas lentes de aumento de 20 vezes.

A classificação por microscopia de luz polarizada permite a classificação das estruturas em sistemas líquido-cristalinos (SLC) e microemulsão (ME), classificação esta confirmada posteriormente por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Depois dessa classificação, os quatro diagramas foram delimitados novamente conforme as estruturas encontradas. Foi selecionado um SPCL de cada diagrama para os demais estudos, que foram nomeados como FA (diagrama 1), FQ (diagrama 2), FP (diagrama 3) e FPQ (diagrama 4).

4.2.6 Efeito dos componentes da saliva artificial na estrutura do SPCL selecionados

Foram acrescentados 30% (FA30, FQ30, FP30, FPQ30) e 100% (FA100, FQ100, FP100, FPQ100) de saliva artificial em relação à massa inicial dos SPCL selecionados (FA, FQ, FP, FPQ). Esses sistemas foram classificados visualmente e por microscopia de luz polarizada e caracterizados por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), análises reológica contínua, análise reológica oscilatória e mucoadesão.

A composição da saliva artificial utilizada foi de 8 g/L de cloreto de sódio (NaCl), 0,19 g/L de fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄), 2,38 g/L de fosfato dissódico (Na₂HPO₄) com pH 6,8 (MARQUES *et al.*, 2011).

4.2.7 Microscopia de luz polarizada

Foi realizada como descrito no item 4.2.5.2

4.2.8 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Brasil), na linha SAXS1. Esta linha é equipada com um monocromador ($\lambda = 1.488 \text{ \AA}$) e um detector vertical localizado cerca de 1,5 m da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento $I(q)$, em função do vetor de espalhamento, q . O espalhamento das micas e do ar foram subtraídos da intensidade total espalhada. Cada espectro foi coletado por 45 segundos. Essa instalação permitiu um vetor de espalhamento, q , entre aproximadamente $0,1$ e $2,3 \text{ \AA}^{-1}$.

4.2.9 Análises reológicas

Para a caracterização reológica dos sistemas, primeiramente, foram realizadas análise de reprodutibilidade para calibração do pesquisador e o projeto piloto para a estimativa do tamanho da amostra para serem utilizadas na análise reológica contínua e na análise reológica oscilatória, conforme etapas 3.2.6.3.1 e 3.2.6.3.2.

4.2.9.1.1 Análise reológica contínua

Os reogramas dos sistemas foram obtidos empregando reômetro modelo AR2000 – TA Instruments® utilizando geometria steel plate com 40 mm de diâmetro e com gap de 200 μm para os sistemas poucos viscosos e utilizando geometria cone/placa com 40 mm de diâmetro, 2° de ângulo e gap de 52 μm para os sistemas mais viscosos.

Uma amostra com três gramas dos sistemas foi colocada, cuidadosamente, na placa inferior do reômetro, e esperou-se o tempo de repouso de 3 minutos para o início da análise. A taxa de cisalhamento utilizada foi de 0 a 100 s^{-1} para a curva ascendente e de 100 a 0 s^{-1} para a curva descendente, durante 120 segundos cada, à temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os índices de consistência e fluxo foram determinados pela Equação 1 para a análise quantitativa do comportamento de fluxo:

$$\tau = k \cdot \gamma^n \quad (\text{Equação 1})$$

onde “ τ ” é a força de cisalhamento, “ γ ” é a taxa de cisalhamento, “ k ” é o índice de consistência e “ n ” é o índice de fluxo (CALIXTO *et al.*, 2015).

Para a análise reprodutibilidade para calibração do pesquisador, o ensaio foi realizado em 20 amostras independentes, sendo 10 análises em uma ocasião e as 10 restantes.

Para o projeto piloto para estimativa do tamanho da amostra, o ensaio foi realizado em 10 amostras independentes, sendo 3 análises em uma ocasião, 3 em outra ocasião e as 4 restantes em outra ocasião.

Para o projeto final, a análise foi realizada em triplicata, que foi o tamanho amostral estimado pelo projeto piloto.

4.2.9.1.2 Análise reológica oscilatória

A análise oscilatória foi realizada também em reômetro modelo AR2000 – TA Instruments[®] utilizando geometria steel plate com 40 mm de diâmetro e com gap de 200 μm para os sistemas poucos viscosos e utilizando geometria cone/placa com 40 mm de diâmetro, 2° de ângulo e gap de 52 μm para os sistemas mais viscosos.

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

Após a determinação da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, realizou-se o teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 10 Hz, à tensão de 1 Pa, numa temperatura de 37 °C (CALIXTO *et al.*, 2015).

Para a análise reprodutibilidade para calibração do pesquisador, o ensaio foi realizado em 20 amostras independentes, sendo 10 análises em uma ocasião e as 10 restantes.

Para o projeto piloto para estimativa do tamanho da amostra, o ensaio foi realizado em 10 amostras independentes, sendo 3 análises em uma ocasião, 3 em outra ocasião e as 4 restantes em outra ocasião.

Para o projeto final, a análise foi realizada com seis amostras independentes, que foi o tamanho amostral estimado pelo projeto piloto.

4.2.10 Análise de perfil de textura

O perfil de textura dos sistemas selecionados foi analisado utilizando um analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Inglaterra), a partir do qual é possível analisar propriedades mecânicas, tais como a dureza, compressibilidade, adesividade e coesão. O teste foi realizado para as amostras FA100, FP100, FQ100, FPQ100 e com a formulação comercial Oncileg[®]-A. Para a realização do teste, os sistemas selecionados (15 g) foram colocados em tubos de centrifuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD[®], Franklin Lakes, EUA) e centrifugados a 680g durante 3 minutos, para eliminar as bolhas de ar e tornar a sua superfície lisa. Em seguida, esses tubos foram colocados embaixo da sonda analítica (10 mm de diâmetro) do analisador de textura, que foi programado para comprimir a amostra a velocidade de 0,5 mm/s até a profundidade pré-definida (10 milímetros) e retornar para a superfície da amostra na mesma velocidade. Após 5 segundos de repouso, uma segunda compressão iniciou-se, nas mesmas condições. O esquema ilustrativo está na Figura 4. Todas as análises foram realizadas em setes replicatas, à temperatura de 25°C.

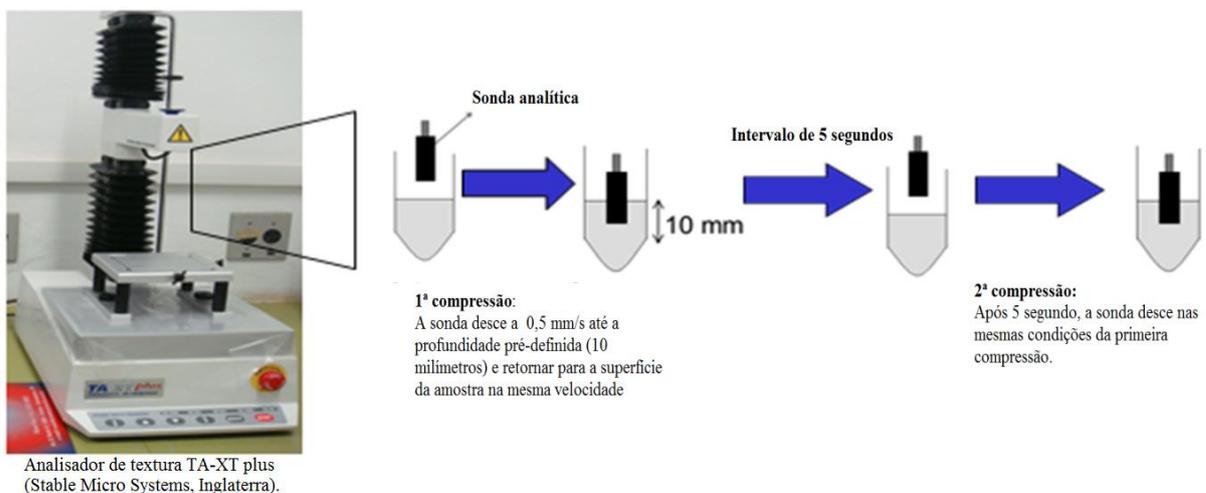


Figura 4. Esquema ilustrativo da análise de perfil de textura.

4.2.11 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

Para a avaliação da força mucoadesiva *in vitro* das formulações, primeiramente, foram obtidas mucosas esofágicas de porco do matadouro Olhos d'Água localizado em Ipuã (SP), transportadas e armazenadas em meio com saliva e em banho com gelo, até seu processamento em no máximo 6h após a morte dos animais. A mucosa esofágica foi separada

dos tecidos subjacentes com auxílio de tesoura anatômica e bisturi, mantendo a uniformidade da espessura dos cortes de aproximadamente 1 mm. Lavou-se a mucosa com água corrente e a manteve em solução salina até sua utilização.

A força necessária para remover os sistemas selecionados dessa mucosa esofágica suína foi avaliada *in vitro*, utilizando o analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Surrey Inglaterra), no modo Adhesion Test. Primeiramente, a mucosa foi imersa em saliva humana para simular o ambiente bucal por 30 segundos. A mucosa foi fixada à extremidade inferior da sonda cilíndrica (10 mm de diâmetro) do equipamento. As formulações foram acondicionadas em pequenos recipientes de vidro sob a sonda à 37 °C. O teste foi iniciado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mm/s) até que a mucosa entrasse em contato com a amostra. A mucosa e a amostra foram mantidas em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este tempo. Em seguida, a sonda subiu a velocidade constante (0,5 mm/s) até ocorrer o destacamento entre a mucosa e a amostra. O esquema está ilustrado na Figura 5. A força necessária para ocorrer esse destacamento foi calculada pela curva força versus tempo.

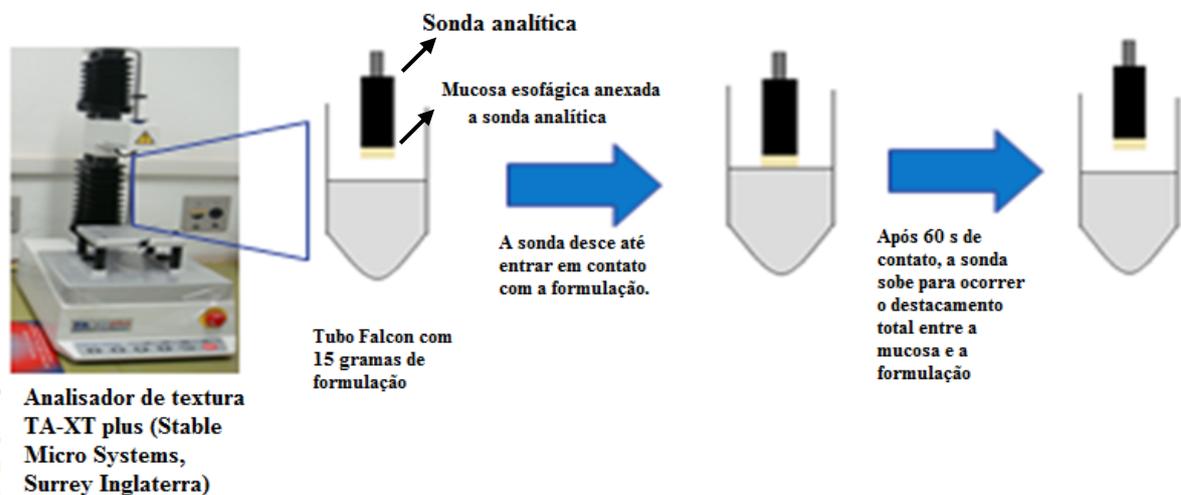


Figura 5. Esquema ilustrativo do teste de mucoadesão *in vitro*.

Para a análise reprodutibilidade para calibração do pesquisador, o ensaio foi realizado em 20 amostras independentes, sendo 10 análises em uma ocasião e as 10 restantes.

Para o projeto piloto para estimativa do tamanho da amostra, o ensaio foi realizado em 10 amostras independentes, sendo 3 análises em uma ocasião, 3 em outra ocasião e as 4 restantes em outra ocasião.

Para o projeto final, a análise foi realizada em seis amostras independentes das formulações desenvolvidas e com a formulação comercial Oncileg[®]-A

4.2.12 Validação da metodologia analítica para quantificação do CTT1 por espectrofotometria no UV-vis.

A validação da metodologia analítica foi realizada usando os parâmetros: linearidade, precisão intra-corrída e intermediária, exatidão, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação, sugeridos pelos guias ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2003), utilizando espectrofotômetro UV Carry 60 (Agilent Technologies, EUA) com comprimento de onda de 280 nm.

4.2.12.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas, determinada pela análise de seis níveis de concentração diferentes em três dias diferentes. A solução mãe foi preparada dissolvendo 1 mg de peptídeo em 1 mL de água Milli-Q. A partir dessa solução mãe foram preparadas seis diluições (200 µg/mL, 160 µg/mL, 120 µg/mL, 80 µg/mL, 60 µg/mL e 20 µg/mL), em triplicata, utilizando-se a água Milli-Q como diluente. A partir da média dos valores das áreas encontrados e das concentrações testadas para as três curvas, a equação da reta foi determinada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do modelo, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste unilateral, $p < 0,05$.

4.2.12.2 Seletividade

A fim de garantir que não haja interferência na detecção e quantificação do peptídeo com os componentes das formulações, as formulações sem os fármacos foram diluídas em solvente e analisadas em triplicata.

4.2.12.3 Precisão

Para o estudo de precisão foram utilizadas as concentrações de 60 µg.mL⁻¹, 80 µg.mL⁻¹ e 120 µg.mL⁻¹ de peptídeo, determinadas em triplicata. As análises foram realizadas em dois dias diferentes, não consecutivos. As médias dos resultados obtidos foi avaliada pelo teste t de *Student* (teste bilateral, $p < 0,05$).

4.2.12.4 Exatidão – recuperação

A exatidão foi avaliada através de teste de recuperação da concentração dos fármacos ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$) obtida na metodologia de quantificação comparada com a quantidade conhecida dos fármacos na amostra. Os experimentos foram feitos em triplicata para cada concentração. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, calculada pela Equação 2.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \quad (\text{Equação 2})$$

4.2.12.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando valores de desvio padrão (DP) e inclinação das curvas analíticas obtidas. Os LD e LQ teóricos foram obtidos através do cálculo das Equações 3 e 4, respectivamente:

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad \text{Equação 3} \quad LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad \text{Equação 4}$$

onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y e IC é a inclinação da curva analítica.

4.2.13 Validação da metodologia analítica para quantificação do azul de metileno por espectrofotometria V-vis.

A validação da metodologia analítica foi realizada usando os parâmetros: linearidade, precisão intra-corrída e intermediária, exatidão, especificidade/seletividade, limite de detecção e limite de quantificação, sugeridos pelos guias ICH (2005) e ANVISA (BRASIL, 2003), utilizando espectrofotômetro UV Carry 60 (Agilent Technologies, EUA) com comprimento de onda de 660 nm.

4.2.13.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas, determinada pela análise de seis níveis de concentração diferentes em três dias diferentes. A solução mãe foi preparada dissolvendo 5 mg de azul de metileno em 100 mL de água Milli-Q. A partir dessa

solução mãe foram preparadas seis diluições (5 ug/mL, 4 ug/mL, 3 ug/mL, 2 ug/mL, 1 ug/mL e 0,5 ug/mL), em triplicata, utilizando-se a água Milli-Q como diluente. A partir da média dos valores das áreas encontrados e das concentrações testadas para as três curvas, a equação da reta foi determinada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do modelo, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste unilateral, $p < 0,05$.

4.2.13.2 Seletividade

A fim de garantir que não haja interferência na detecção e quantificação do azul de metileno com os componentes das formulações, as formulações sem os fármacos foram diluídas em solvente e analisadas em triplicata.

4.2.13.3 Precisão

Para o estudo de precisão foram utilizadas as concentrações de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AM, determinadas em triplicata. As análises foram realizadas em dois dias diferentes, não consecutivos. As médias dos resultados obtidos foram avaliadas pelo teste t de *Student* (teste bilateral, $p < 0,05$).

4.2.13.4 Exatidão – recuperação

A exatidão foi avaliada através de teste de recuperação da concentração dos fármacos ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) obtida na metodologia de quantificação comparada com a quantidade conhecida dos fármacos na amostra. Os experimentos foram feitos em triplicata para cada concentração. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, calculada pela Equação 2.

4.2.13.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando valores de DP e inclinação das curvas analíticas obtidas. Os LD e LQ teóricos foram obtidos através do cálculo das Equações 3 e 4, respectivamente.

4.2.14 Avaliação da cinética de liberação *in vitro* do peptídeo CTT1 e do azul de metileno (AM)

O estudo de liberação do CTT1 e do AM em solução e incorporados nas formulações FA e FPQ foi realizado no equipamento Microette (Hanson) constituído por células de difusão de Franz. Foi utilizada membrana sintética de acetato de celulose com massa molar de 12–14 kDa (Sigma-Aldrich) e solução receptora composta por água Milli Q à 37 °C e sob agitação de 300 rpm. As amostras (CTT1 em solução, CTT1 incorporado na FA, CTT1 incorporado na FPQ, AM em solução, AM incorporado na FA e AM incorporado na FPQ) foram previamente pesadas (300 mg) e transferidas para o anel dosador disposto no compartimento doador da célula de difusão de Franz. As amostras foram coletadas do compartimento receptor em tempos pré-determinados (5 min, 30 min, 1 h, 2h, 4h, 8h, 12h, 18h e 24h). O CTT1 liberado das amostras foi quantificado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm a partir do método analítico validado e o AM liberado das amostras foi quantificado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm também a partir do método analítico validado.

4.2.15 Estudo da fotodegradação (*photobleaching*)

As amostras de AM, em solução ou incorporado na FPQ, foram submetidas à fonte de luz (LEDs – light emitting diode) no espectro da luz vermelha em 660 nm e com potência de saída de 100 mW. A luz foi aplicada por 20 minutos, de maneira a cobrir toda extensão das amostras, que foram submetidas ao estudo do espectro para verificar a fotodegradação após a irradiação (VIRKUTYTE *et al.*, 2010). A fotodegradação do AM foi estudada por espectroscopia empregando espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, modelo UV- 1800). O espectro de absorção de cada amostra foi registrado na faixa de comprimento de onda de 310 a 800 nm (FERREIRA *et al.*, 2005).

4.2.16 Ensaio de dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular do peptídeo CTT1 em solução (P) e incorporado na formulação (FPQ-P) foram obtidos pelo equipamento espectrômetro/espectropolarímetro de dicroísmo circular Jasco modelo J – 815 na região de comprimento de luz entre 360 e 220 nm.

4.2.17 Zimografia em gel

Esse teste foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Rossa Junior da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Para avaliar a inibição da atividade de MMP-9 e MMP-2 pelo peptídeo CTT1 (P) em solução e incorporado na formulação (FPQ-P), macrófagos murinos foram estimulados com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo bacteriano durante 24 h e o meio condicionado foi coletado. P e FPQ-P foram incubados com as concentrações indicadas à temperatura ambiente (25 °C) durante 1 h, com um volume do meio condicionado contendo 5 µg de proteína total. No final do período de incubação, as amostras foram carregadas num gel de poliacrilamida a 10% contendo 5% de gelatina e separadas por eletroforese em condições não desnaturantes. Depois de uma lavagem de 30 min em 2,5% de Triton X-100 para renaturação das proteínas, os géis foram colocados em tampão (Tris.Cl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, 0,02% de Brij-35, pH 7,5) durante 18 h. Os géis foram depois corados em 0,5% de Comassie blue durante 30 min e de-coradas numa solução de ácido/metanol acético durante 10 min. Imagem digital do gel foi obtida sob epi-iluminação em um sistema de documentação de gel (Chemi-Doc Xr, Bio-Rad).

4.2.18 Teste de citotoxicidade *in vitro* pelo ensaio de Sulforrodamina B (SRB)

Esse teste foi realizado durante o estágio de pesquisa no exterior (BEPE – Proc. n° 2016/06337-5) na Universidade do Minho (Portugal) sob orientação da Profa. Fátima Baltazar.

4.2.18.1 Linhagem celular

Nesse estudo foram utilizadas a linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de língua (SCC-25) e a linhagem celular derivada de carcinoma de útero (SiHA). SCC-25 foi fornecida pela Prof. Dr. Bruno Sarmiento do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade do Porto, Portugal.

4.2.18.2 Cultivo celular

A linhagem celular SiHa foi cultivada em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 1×, High Glucose; Gibco, Invitrogen) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen) e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (Gibco, Invitrogen). A

linhagem celular SCC-25 foi cultivada em uma mistura 1:1 (v/v) DMEM e Ham's F12 (Gibco, Invitrogen) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen), 1% de solução de penicilina e estreptomicina (Gibco, Invitrogen) e 40 ng/mL de hidrocortisona. As células foram mantidas em atmosfera com 5% de CO₂, 95% umidade relativa e à temperatura constante de 37 °C.

4.2.18.3 Avaliação de citotoxicidade pelo ensaio de Sulforodamina B

As células foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma densidade de 8000 células de SCC-25 por poço. As células foram deixadas aderir durante a noite e, em seguida, foram tratadas com várias concentrações de formulação (0,5%, 0,25%, 0,12%, 0,06% e 0,03% de formulação FPQ) diluídas em meio de cultura sem soro e com várias concentrações de peptídeo CTT1 diluídos em PBS1x (400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL) por 12 horas, 24 horas e 72 horas. Todos os procedimentos foram executados na ausência de luz policromática incidente sobre as células. O efeito de ambos os tratamentos foi avaliado pelo ensaio de Sulforodamina B (SRB, TOX-6, Sigma-Aldrich) que é um método para a monitorização da citotoxicidade *in vitro* (medição da biomassa total) por meio da coloração das proteínas celulares com Sulforodamina B. Assim, após os diferentes tempos de incubação das células com os diferentes tratamentos, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas a frio com 10% de ácido tricloroacético (TCA) durante 1 hora a 4 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com água destilada para remover o TCA e, em seguida, foram secas ao ar durante a noite. Após secarem, as células foram coradas com uma solução de 0,4% de Sulforodamina B durante 30 minutos e, depois do período de coloração, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com ácido acético a 1% até o corante não incorporado ser totalmente removido. As placas foram novamente secas ao ar durante a noite e, então, a Sulforodamina B incorporada foi solubilizada numa solução de base Tris 10 mM com agitação durante 20 minutos no agitador de placas à temperatura ambiente. A medição espectrofotométrica da absorbância a 490 nm foi realizada, utilizando 690 nm como a absorbância de fundo (Tecan Infinito M200). Os valores da análise foram estimados a partir de três experiências independentes utilizando o software GraphPadPrism 5, aplicando-se uma dose-resposta sigmoidal (declive variável) de regressão não-linear, depois da transformação logarítmica.

4.2.19 Avaliação de foto e citotoxicidade pelo método de redução do MTT

Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Citologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP sob orientação da Profa. Dra. Christiane Pienna Soares.

4.2.19.1 Linhagens celulares

As linhagens celulares usadas nesse estudo foram HSC-3 (carcinoma de células escamosas orais) e a HaCat (células originárias de pele histologicamente normal transformadas espontaneamente *in vitro*) cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.2.19.2 Cultivo Celular

Todas as linhagens foram cultivadas em uma mistura 1:1 (v/v) DMEM e Ham's F12 (Sigma Co., St. Louis, EUA) acrescida de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B, 0,1 mg/mL de canamicina (Sigma Co., St. Louis, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultlab, Campinas, Brasil). As células foram mantidas em atmosfera com 5% de CO₂, 95% umidade relativa e à temperatura constante de 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com 3 mL de solução de Hank (0,4 g de KCl; 0,06 g de KH₂PO₄; 0,04 g de Na₂HPO₄; 0,35 g de NaHCO₃; 1 g de glicose, H₂O q.s.p. 1.000 mL) e desprendidas da garrafa com 2 mL de Tripsina EDTA 0,05% (Gibco, Waltham, MA, EUA). Após o desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com 3 mL de DMEM/F12 acrescido de 10% de soro fetal bovino e a suspensão celular obtida foi transferida para outras garrafas. Esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade de células suficiente para os ensaios (de FREITAS *et al.*, 2014).

4.2.19.3 Avaliação de citotoxicidade pelo método de redução do MTT

Para a calibração da pesquisadora para realização do teste de citotoxicidade, as linhagens HaCaT e HSC3 foram cultivadas em 20 poços da placa de 96 poços por 24h, a uma concentração de 1×10^5 células/mL. Em seguida, o meio de cultura (DMEM/F12 + 10% SFB) foi removido e 20 poços de células foram tratados com a formulação solubilizada em DMEM/F12 sem soro e os outros 20 poços foram tratados com o controle negativo, sendo utilizada pipeta monocal em 20 poços e pipeta multicanal nos outros 20 poços. Após o

período de incubação de 3h, as células foram recuperadas por 24 horas em DMEM/F12 +10% SFB. Todos os procedimentos foram executados na ausência de luz policromática incidente sobre as células.

Após a calibração da pesquisadora, as linhagens HaCaT e HSC3 foram cultivadas em placa de 96 poços por 24h, a uma concentração de 1×10^5 células/mL. Em seguida, o meio de cultura (DMEM/F12 + 10% SFB) foi removido e as células foram tratadas com a formulação solubilizada em DMEM/F12 sem soro. Após o período de incubação de 1h ou 3h, as células foram recuperadas por 24 horas em DMEM/F12 +10% SFB. Todos os procedimentos foram executados na ausência de luz policromática incidente sobre as células.

O MTT {brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} é um corante tetrazólico de cor amarela, solúvel em água, que é reduzido pelas células vivas (mas não pelas mortas) a um produto violeta e insolúvel em soluções aquosas. A solubilização desse produto e sua quantificação espectrofotométrica permite determinar a porcentagem de células vivas presentes no meio. Dessa forma, a redução do MTT permite avaliar o potencial citotóxico da terapia em estudo (TOLOSA *et al.*, 2015).

A solução de MTT foi preparada em duas etapas: primeiro, o sal foi dissolvido em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10,1 mM, KH_2PO_4 1,8 mM pH7,4) a uma concentração de 5 mg/mL; em seguida, essa solução foi diluída 1:10 em meio de cultura sem soro para uma concentração final de 0,5 mg/mL. Após o período de recuperação, o meio de cultura foi removido das placas e cada poço recebeu a adição de 100 μL de MTT a 0,5 mg/mL; a placa foi então incubada a 37 °C por 3 horas. A solução de MTT foi removida e 100 μL de isopropanol acidificado (HCl 0,04 M) foram adicionados para solubilizar os cristais violeta, e a placa levada para a dupla leitura espectrofotométrica em 570 nm em leitor de placas Bio-Tek Powerwave X (BioTek Instruments, Inc., EUA), com agitação prévia de 5 minutos em baixa velocidade. A porcentagem de células vivas em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade do tratamento, foi calculada em relação ao controle negativo, de acordo com a Equação 5 (de FREITAS *et al.*, 2014):

$$\% \text{ de células vivas em relação ao controle negativo} = \frac{(\text{média de absorvância do teste} - \text{média de absorvância do branco})}{(\text{média de absorvância do controle negativo} - \text{média do absorvância do branco})} \times 100$$

(Equação 5)

4.2.19.4 Avaliação de fotocitotoxicidade pelo método de redução do MTT

4.2.19.4.1 Fonte de luz

A fonte de luz de 660 nm utilizada consiste de um sistema de iluminação LED compacta com uma área de iluminação homogênea e um dispositivo de refrigeração, composto por 48 LEDs com intensidades variáveis (IrradLED - Biopdi, São Carlos, SP, Brasil). A distância entre o LED e a placa permite uma distribuição uniforme de luz em cada poço.

4.2.19.4.2 Tratamento com a formulação selecionada FPQ

As linhagens HaCaT e HSC3 foram cultivadas em placa de 96 poços por 24 horas, a uma concentração de 1×10^5 células/mL. Em seguida, o meio de cultura (DMEM/F12 + 10% SFB) foi removido e as células foram tratadas com azul de metileno em solução (AM), azul de metileno incorporado na formulação (FAM) solubilizado em DMEM/F12 sem soro e com o controle negativo. Após o período de incubação de 1h, mesmo tempo de tratamento estabelecido para o peptídeo CTT1 no ensaio de zimografia em gel, as células foram tratadas ou não com luz (Biotable 660 nm) com uma dose de luz de $12,5 \text{ J/cm}^2$ ou 25 J/cm^2 . Após a incidência da luz, as células foram incubadas por 24 horas em DMEM/F12 com 10% SFB. Todos os procedimentos foram executados na ausência de luz policromática incidente sobre as células (de FREITAS *et al.*, 2014). A porcentagem de células vivas em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, foi calculada em relação ao controle negativo, de acordo com a Equação 2 do item 4.2.19.3.

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

Esse teste foi realizado durante o estágio de pesquisa no exterior (BEPE – Proc. n° 2016/06337-5) na Universidade do Minho (Portugal) sob orientação da Profa. Fátima Baltazar.

4.2.20.1 Obtenção dos ovos embrionados

Os ovos embrionados (PintoBar, Braga, Portugal) utilizados nesse ensaio foram adquiridos no primeiro dia de fecundação. Os ovos foram incubados na estufa úmida a $37 \text{ }^\circ\text{C}$

até o segundo dia de desenvolvimento embrionário (ED 1 e ED 2). No terceiro dia (ED3), os ovos foram retirados da estufa para a abertura de uma janela utilizando uma pinça e uma tesoura, que logo após sua abertura foi fechada com uma fita adesiva e então os ovos foram recolocados na estufa úmida a 37 °C.

4.2.20.2 Ensaio para avaliação das alterações vasculares da CAM

Para a realização desse ensaio, no ED 8, um anel de plástico com 3 mm de diâmetro foi colocado sobre a CAM e foram tiradas fotografias. No ED 13 foi aplicado 40 µL de formulação. Após 4 dias, foi constatada a morte dos embriões. Portanto, foi realizado outro protocolo de tratamento com a aplicação de 10 µL de formulação por dia do ED 13 até o ED 16. Assim, no ED 17 foram tiradas fotografias e os ovos foram sacrificados a – 80 °C. O esquema ilustrativo está na Figura 6.

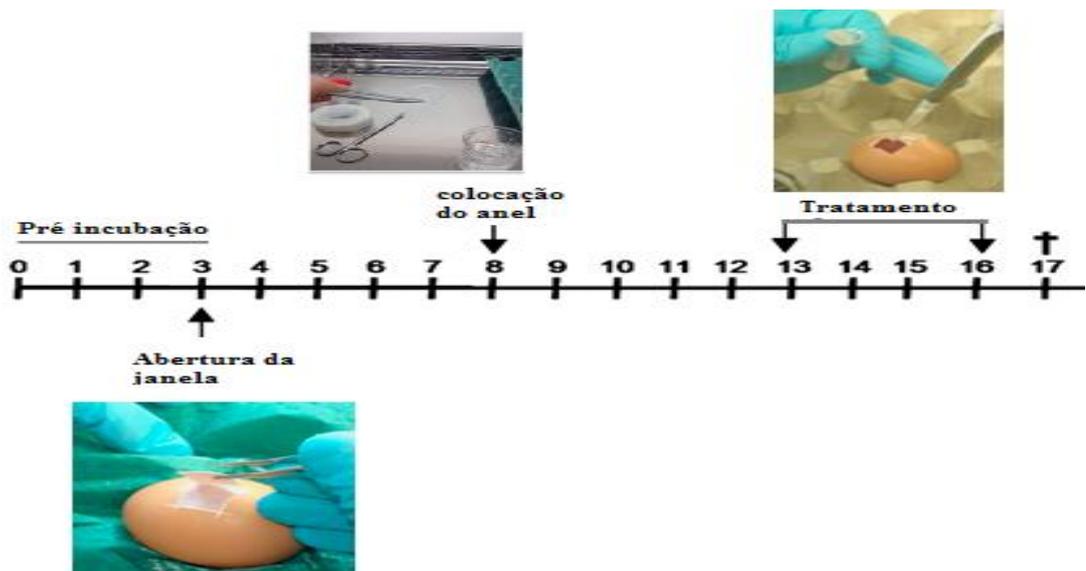


Figura 6. Representação esquemática para avaliação das alterações vasculares da membrana corioalantóica (CAM) de ovos de galinha.

4.2.20.3 Ensaio para avaliação do crescimento tumoral

Para a realização desse ensaio foi formado um tumor utilizando apenas as células SiHA, uma vez que essas células conseguem se proliferar rapidamente tendo em vista o período curto de estágio da bolsista. Dessa forma, no ED 10, $1,5 \times 10^6$ células foram ressuspendidas em 10 µL de Matrigel e inseridas sobre a CAM. Foi realizado o tratamento

seguindo o mesmo protocolo do item 2 acima, ou seja, foram aplicados 10 μ L dos diferentes tratamentos por dia do ED 13 até o ED 16. Os tratamentos estão descritos no Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos para a avaliação do crescimento tumoral em CAM.

Tratamentos	FPQ10	CTT1	AM	TFD
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	-	+	-	-
4	+	-	-	+
5	-	-	+	-
6	-	-	+	+
7	+	-	+	-
8	+	-	+	+

FPQ10 é 10 % do sistema líquido cristalino diluído em PBS1x; CTT1 é o peptídeo; AM é o fotossensibilizador azul de metileno; TFD é a terapia fotodinâmica com dose de luz de 100 J/cm² utilizando um LED desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT, USP São Carlos) com o comprimento de onda de 660 nm; (+) presença; (-) ausência.

No ED 17 foram tiradas fotografias *in ovo* utilizando um microscópio estereoscópico (Olympus S2 \times 16) com câmera digital (Olympus DP71) e os ovos foram sacrificados a -80°C por 10 minutos. Após o sacrifício dos ovos, a CAM foi dissecada e colocada em placa de 6 poços com PBS 1x e foram fotografadas *ex ovo* para a contagem dos vasos sanguíneos. O esquema ilustrativo está na Figura 7.

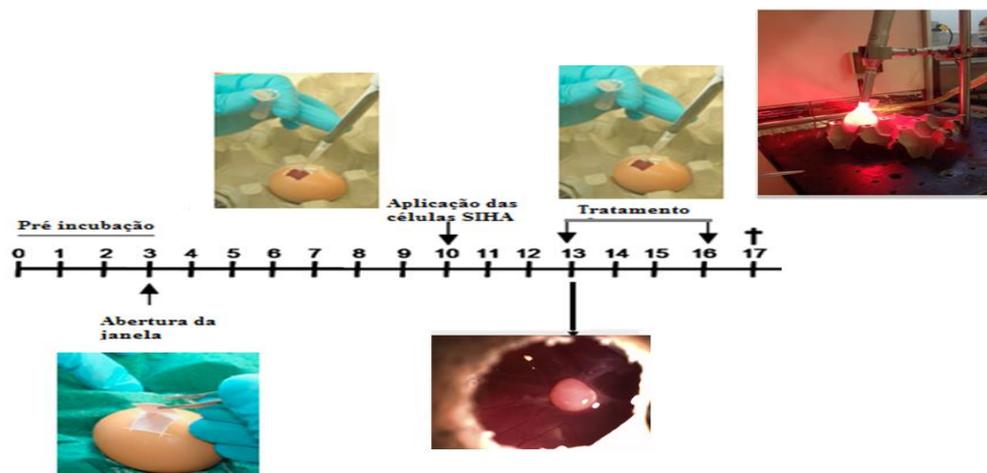


Figura 7. Representação esquemática para avaliação do crescimento tumoral utilizando o modelo “*in vivo*” de membrana corioalantóica (CAM) de ovos de galinha.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção dos diagramas de fases

O diagrama de fases é uma ferramenta utilizada para visualizar a quantidade necessária de fase oleosa, fase aquosa e tensoativo para a formação de diferentes domínios, tais como emulsões, microemulsões e sistemas líquidos cristalinos, pois esses diagramas são representados por um triângulo equilátero cujo vértice superior do triângulo representa 100% de tensoativo, o vértice esquerdo representa 100% de fase aquosa e o vértice direito representa 100% de fase oleosa (LAWRENCE e REES, 2000). Portanto, a construção desses diagramas serve como ponto de partida para o estudo de delineamento desses domínios, pois revela o comportamento físico químico da mistura de diferentes proporções das fases, facilitando a escolha da formulação mais adequada para a finalidade proposta (FEIGENSON *et al.*, 2001).

Nesse trabalho, foram construídos quatro diagramas sendo que cada diagrama possuiu 54 combinações diferentes de tensoativo, fase aquosa e fase oleosa, resultando, portanto, no preparo de 216 formulações.

Todas essas formulações foram classificadas visualmente em separação de fases (SF), sistema opaco (SO), sistema líquido transparente (SLT) e sistema viscoso transparente (SVT), conforme ilustrados da Figura 8.

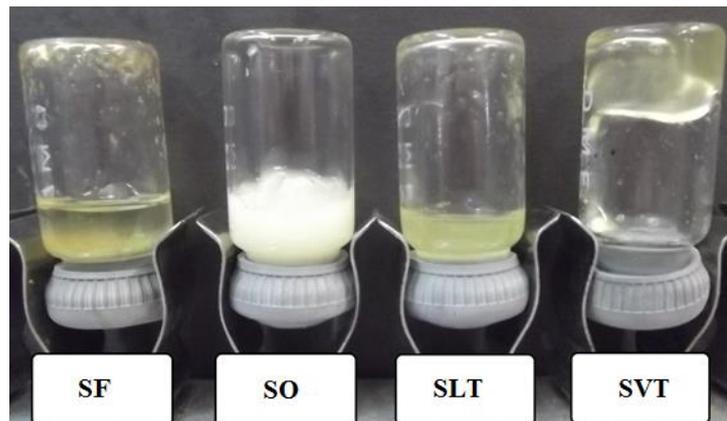


Figura 8. Aspecto visual das formulações classificadas como separação de fases (SF), sistema opaco (SO), sistema líquido transparente (SLT), sistema viscoso transparente (SVT).

Após essa classificação, tais regiões foram delimitadas, conforme ilustrado na Figura 9, a fim de comparar a influência no aspecto visual das diferentes fases aquosas.

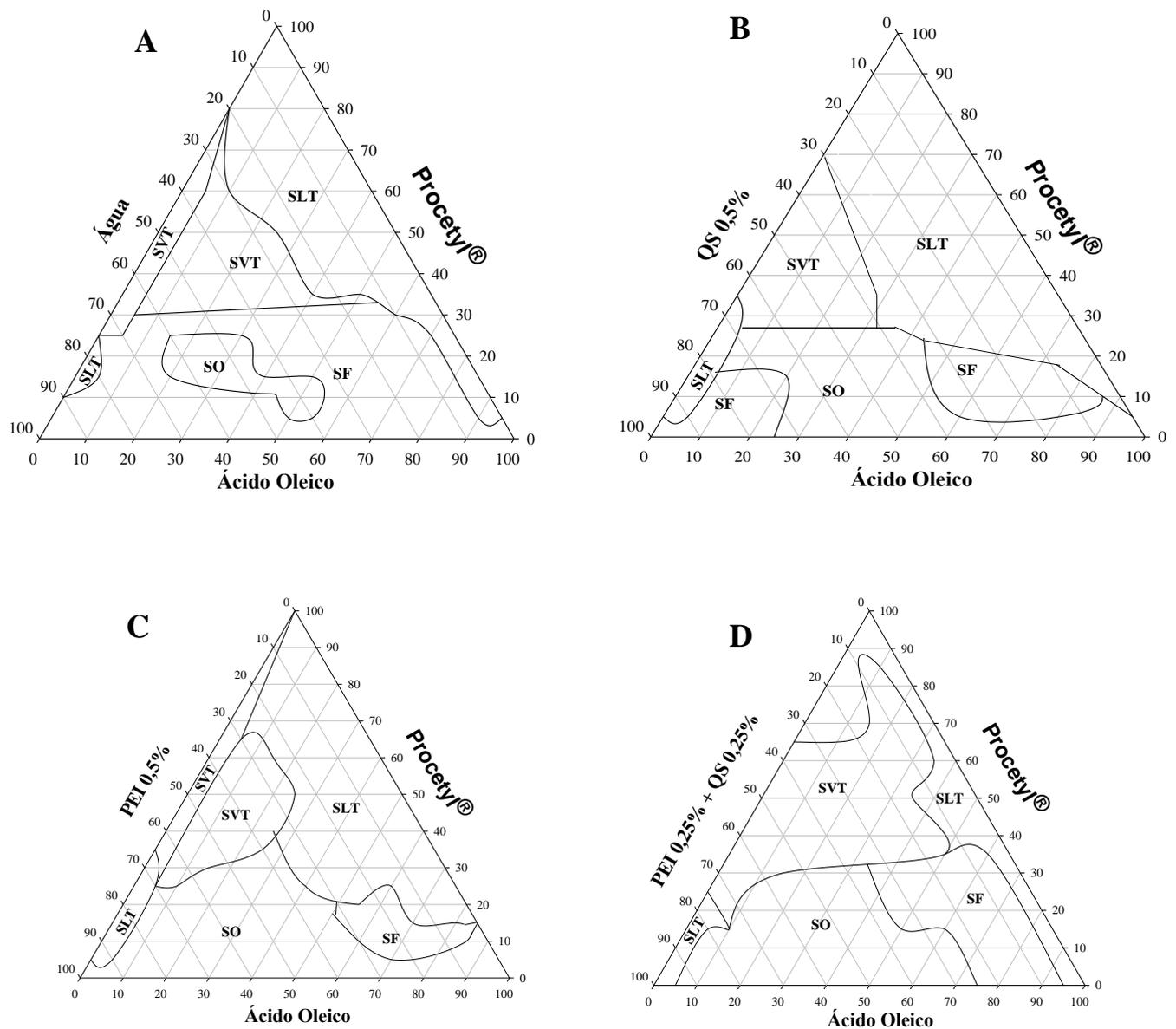


Figura 9. Classificação visual dos diagramas compostos por Procetyl (PRO), ácido oleico (AO) e (A) água (A), (B) Quitosana (QS), (C) Polietilenoimina (PEI), (D) PEI + QS, onde: Sistema Líquido Transparente (SLT), Sistema Viscoso Transparente (SVT), Sistema Opaco (SO) e Separação de fases (SF).

Desse modo, primeiramente, foi obtido o Diagrama 1 utilizando Procetyl[®] AWS (PRO) como tensoativo, ácido oleico (AO) como fase oleosa e água (A) como fase aquosa, observado na Figura 9.A. Ao observar esse diagrama formado, nota-se que, em concentração

abaixo de 40%, ocorreu uma grande região de separação de fases (SF) com uma pequena região de sistema opaco entre 10 a 25% de tensoativo e entre 20 a 30% de fase oleosa. Obteve-se uma ampla região de sistema líquido transparente abaixo de 25% de água, abrangendo quase todo eixo de tensoativo e de fase oleosa. De 40% a 75% de tensoativo, entre 25% e 75% de água e abaixo de 50% de óleo, obteve-se uma região de sistemas viscosos. Carvalho *et al.* (2013) e Fonseca-Santos (2015) também prepararam esse diagrama e obtiveram resultados semelhantes.

O Diagrama 2 ilustrado na Figura 9.B representa os sistemas obtidos utilizando Procetyl[®] AWS (PRO) como tensoativo, ácido oleico (AO) como fase oleosa e dispersão de quitosana 0,5% (A) como fase aquosa. Nota-se duas pequenas regiões de separação de fases: (i) entre 5% e 25% de tensoativo, 5% e 35% de fase aquosa e 45 e 85% de fase oleosa e (ii) abaixo de 20% de fase oleosa, acima de 80% de fase aquosa e abaixo de 20% de tensoativo. Ocorreu uma região extensa de sistemas líquido transparente em concentrações abaixo de 40% de fase aquosa e concentrações acima de 45% de fase oleosa e em toda a extensão de tensoativo e uma extensa região de sistemas opacos acima de 5% de fase oleosa, abaixo de 30% de tensoativo e abaixo de 70% de fase aquosa. Fonseca-Santos (2015) também construiu esse diagrama; no entanto, ele relatou uma região grande de separação de fases. Isso pode ter ocorrido devido ao modo de preparo da dispersão de quitosana pelo autor, a qual foi dispersa em uma concentração menor de ácido acético, o que pode ter levado a uma baixa solubilização da quitosana, pois ela é insolúvel em pH neutro ou básico, mas forma sais solúveis com ácido orgânico como o ácido acético (ILLUM, 1998).

Além disso, o pK da quitosana é 6,5 e o pK do ácido oleico é 4,8. Portanto, no pH em que se encontra a formulação (pH = 5), a quitosana é carregada positivamente e o ácido oleico está carregado negativamente; assim, acredita-se que ocorra uma interação eletrostática entre os grupos catiônicos da porção amina da quitosana e os grupos aniônicos do ácido oleico levando a uma maior estabilização das formulações obtidas e, conseqüentemente, a uma menor taxa de separação de fases desse diagrama (HAM-PICHAVANT *et al.*, 2005).

O Diagrama 3 é inédito e está ilustrado na Figura 9.C que representa os sistemas obtidos utilizando Procetyl[®] AWS (PRO) como tensoativo, ácido oleico (AO) como fase oleosa e dispersão de polietilenoimina 0,5% (A) como fase aquosa. Houve apenas uma pequena região de separação de fases entre 5% e 25% de tensoativo, acima de 50% de fase oleosa e abaixo de 30% de fase aquosa. Sistemas viscosos transparentes foram obtidos abaixo de 70% de fase aquosa, abaixo de 20% de fase oleosa e acima de 25% de tensoativo. Sistemas líquidos transparentes foram formados em uma extensa região acima de 15% de tensoativo,

acima de 5% de fase oleosa e abaixo de 40% de água. Sistemas opacos foram obtidos em toda a extensão de fase oleosa e fase aquosa e abaixo de 30% de tensoativo. Esse diagrama ficou semelhante ao Diagrama 2, ou seja, mostrou menor formação de separação de fases, que pode ser atribuído à grande interação eletrostática entre a polietilenoimina e o ácido oleico, uma vez que a PEI possui pKa entre 9 e 10, portanto em pH ácido ela está carregada positivamente enquanto que o ácido oleico está carregado negativamente (RICARDO *et al.*, 2009).

O Diagrama 4 também é inédito e está ilustrado na Figura 9.D que representa os sistemas obtidos utilizando Procetyl[®] AWS (PRO) como tensoativo, ácido oleico (AO) como fase oleosa e dispersão de polietilenoimina 0.25% e quitosana 0.25% (A) como fase aquosa. Observa-se uma região de separação de fases entre 35% e 95% de fase oleosa, abaixo de 35% de fase aquosa e abaixo de 40% de tensoativo. Houve uma região extensa de sistemas viscosos transparentes entre 10% e 75% de fase aquosa, abaixo de 50% de fase oleosa e entre 15% e 90% de tensoativo e de sistemas opacos entre 5% e 75% de fase oleosa, acima de 25% de fase aquosa e abaixo de 40% de tensoativo. Sistemas líquidos transparentes ocorreram em uma região estreita acima de 85% de fase oleosa, abaixo de 35% de fase aquosa e em toda extensão de tensoativo. Esse diagrama apresentou a maior região de sistemas viscosos. Estudos tem demonstrado que a quitosana age como agente espessante doando viscosidade às formulações, alimentos, etc., no entanto, quando se adiciona ânions à dispersão de quitosana, ela diminui sua viscosidade devido às forças íon-dipolos, ou seja, os ânions formam uma cascata de carga negativa sobre a quitosana gerando forças repulsivas entre as moléculas de quitosana. Isto oferece baixa resistência ao fluxo ou mobilidade das moléculas de quitosana, diminuindo a viscosidade. Entretanto, quando se incorpora o polímero catiônico PEI nos sistemas, pode ocorrer o aumento da viscosidade devido ao aumento de carga positiva dos sistemas (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2010).

Assim, com a adição dos polímeros na fase aquosa do sistema, observa-se uma diminuição da separação de fase, indicando que a adição dos polímeros levou a uma diminuição da coalescência do sistema (KLINKESORN *et al.*, 2009). Os materiais poliméricos apresentam a capacidade de modificar as propriedades estruturais de sistemas de liberação de fármacos devido às várias reticulações de suas cadeias poliméricas que pode provocar mudanças mecânicas e reológicas ao sistema (FERREIRA *et al.* 2015; CARVALHO *et al.*, 2014).

Ao analisar todos os diagramas, pode-se constatar que a partir da concentração de 40% de tensoativo, com adição de água no sistema, tende a ocorrer uma transição de sistemas

líquidos para sistemas viscosos, sendo interessante para SPCL (MALMSTEN *et al.*, 2002, CARVALHO, 2009; SALMAZI *et al.*, 2015).

Após a classificação visual dos sistemas, as formulações classificadas como SLT e SVT foram analisadas por microscópio de luz polarizada.

O microscópio de luz polarizada apresenta a capacidade de propagar o feixe de luz em uma só direção devido à presença de um sistema polarizador de luz acoplado ao seu condensador. As alterações que uma amostra birrefringente provoca na direção da propagação da luz são feitas graças ao analisador, um segundo sistema de polarização, junto à ocular. Desse modo, se a formulação analisada nesse microscópio for capaz de alterar o plano da luz polarizada, ela será classificada como anisotrópica, e se a formulação não conseguir desviar o plano de luz polarizada, ela será classificada isotrópica (SHAH *et al.*, 2001).

As mesofases líquido-cristalinas lamelares e hexagonais são anisotrópicas, pois quando observadas pelo microscópio de luz polarizada são visualizadas estruturas identificadas, respectivamente, por cruzes de malta e estrias, enquanto que a mesofase líquido-cristalina cúbica e as microemulsões são isotrópicas, pois não desviam o plano de luz polarizada e, portanto, é visualizado um campo escuro (SALMAZI *et al.*, 2015), como exemplificado na Figura 10. Ressalta-se que as microemulsões são sistemas líquidos transparentes e as mesofases líquido-cristalinas cúbicas são sistemas viscosos transparentes, portanto a classificação dessas formulações se dá em conjunto com a sua viscosidade, além de outras técnicas de caracterização, como o espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), que será utilizada posteriormente (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2001).

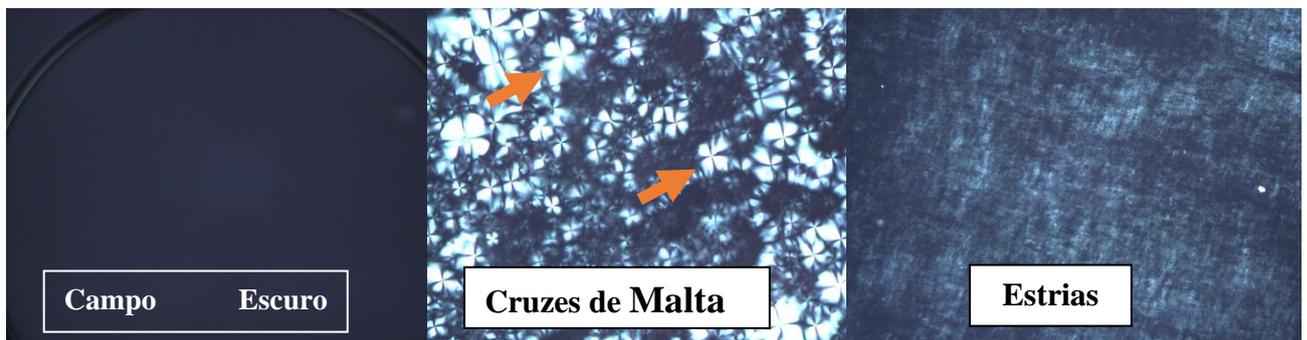


Figura 10. Exemplos de fotomicrografias obtidas pela MLP. As setas vermelhas indicam uma cruz de malta.

Portanto, a microscopia de luz polarizada se tornou uma ferramenta amplamente utilizada para identificação primária de microemulsões e de mesofases de sistemas líquido-cristalinos (CHORILLI *et al.*, 2007).

Antes da realização dessa análise, foi realizada a calibração intrapesquisador. Para isso, foram analisadas 20 fotomicrografias de sistemas líquido-cristalinos em duas ocasiões diferentes. O valor de Kappa calculado para as leituras em MLP foi de 0,76, classificado como “substancial” segundo Landis & Koch (1977). Dessa forma o pesquisador foi considerado calibrado para realização das medidas em MLP.

Após a calibração da pesquisadora, as formulações classificadas como SLT e SVT foram visualizadas pelo MLP e, então, os SLT isotrópicos foram classificados como microemulsão enquanto que os SVT isotrópicos bem como os SVT e SLT anisotrópicos foram classificados como sistema líquido cristalino (SLC). Após essa classificação, foram construídos outros quatro diagramas delimitando essas diferentes regiões, como demonstrado na Figura 11.

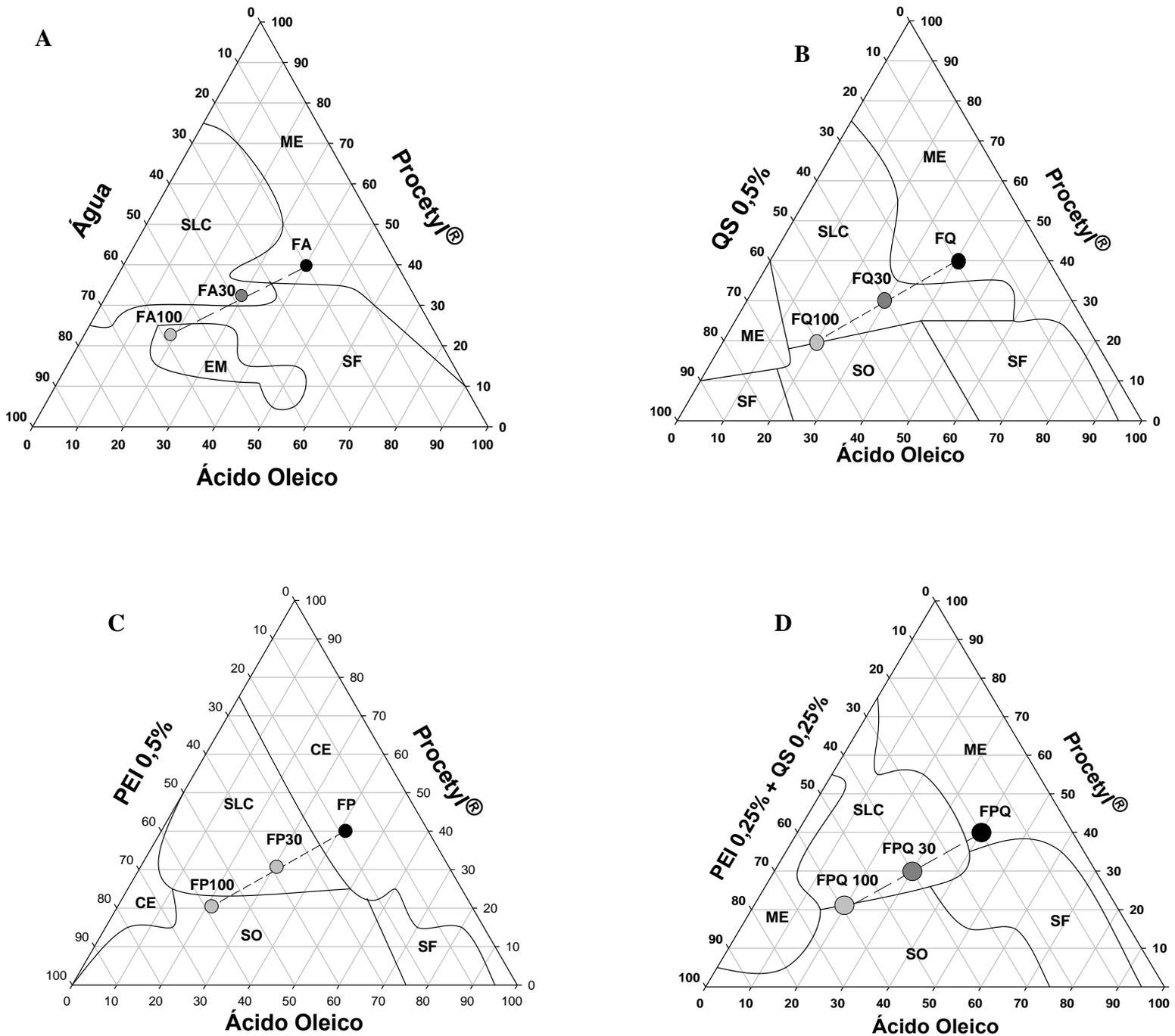


Figura 11. Diagramas ternários compostos por Procetyl (PRO), ácido oleico (AO) e (A) água, (B) Quitosana (QS), (C) Polietilenoimina (PEI), (D) PEI + QS, onde: Sistema Opaco (SO), Microemulsão (ME), Separação de fases (SF). FA, FQ, FP e FPQ são os precursores de sistema líquido cristalino; FA30, FQ30, FP30 e FPQ30 são, respectivamente, as formulações FA, FQ, FP e FPQ com 30% de saliva artificial. FA100, FQ100, FP100 e FPQ100 são, respectivamente, as formulações FA, FQ, FP e FPQ com 100% de saliva artificial.

Todos os diagramas tiveram um comportamento semelhante, ou seja, as formulações compreendidas entre 0 e 20% de fase aquosa e quantidades variadas de tensoativo e fase oleosa são isotrópicas, pois sob o plano de luz polarizada não desviaram a luz, sugerindo a formação de sistema microemulsionado, uma vez que a viscosidade aparente da mesofase líquido-cristalina cúbica é extremamente elevada.

Além disso, aumentando a porcentagem de fase aquosa dos sistemas, observam-se estruturas em formas de estrias e cruzeiros de malta, sugerindo a formação de mesofases líquidas cristalinas hexagonal e lamelar, respectivamente.

A partir desses resultados, selecionou-se uma formulação de cada diagrama que dispusesse de uma baixa concentração de tensoativo para diminuir o potencial tóxico das formulações (KLEIN, 2007), além de se localizar em uma área de transição entre a região de microemulsão e cristal líquido, para poder agir como um sistema precursor de cristal líquido com adição de água, ou seja, que ao entrarem em contato com a saliva, incorporem água da saliva e formem uma estrutura mais organizada, originando mesofases líquido-cristalinas, que podem promover uma maior permanência da formulação na mucosa bucal, além de poderem promover uma liberação controlada do fármaco.

Dessa forma, as formulações escolhidas foram as FA, FQ, FP e FPQ, mostradas na Figura 11, às quais adicionou-se 30% e 100% de saliva para investigar se elas se comportariam como SPCL.

Na Tabela 2 está descrito a nomenclatura e a composição das formulações selecionadas, acrescidas ou não de saliva.

Tabela 2. Nomenclatura e composição (%) das formulações acrescidas ou não com saliva.

Formulações	Ácido Oleico (%)	Procetyl (%)	Água (%)	QS 5% (%)	PEI 5% (%)	QS 2,5% + PEI 2,5% (%)	Saliva (%)
FA	40	40	20	-	-	-	-
FA 30	40	40	20	-	-	-	30
FA 100	40	40	20	-	-	-	100
FQ	40	40	10	10	-	-	-
FQ 30	40	40	10	10	-	-	30
FQ 100	40	40	10	10	-	-	100
FP	40	40	10	-	10	-	-
FP 30	40	40	10	-	10	-	30
FP 100	40	40	10	-	10	-	100
FPQ	40	40	10	-	-	10	-
FPQ 30	40	40	10	-	-	10	30
FPQ 100	40	40	10	-	-	10	100

Como mostrado pela linha de diluição na Figura 11, as formulações FA, FQ, FP e FPQ se comportaram como sistemas precursores de cristal líquido, pois ao se adicionar a saliva elas se transformaram em sistemas líquidos cristalinos.

Essas propriedades de intumescimento *in situ* devem ser de interesse para a administração de fármaco por via bucal, pois é desejado um efeito localizado, por exemplo, na ferida inicial do câncer bucal. Além disso, a formulação é frequentemente exposta a consideráveis esforços mecânicos através de movimentos mastigatórios e também à produção de saliva, que tendem a impedir a localização precisa de uma formulação durante um período prolongado. Assim, a transição de fases para mesofases líquido-cristalinas mais viscosas pode aumentar a mucoadesão da formulação (MALMSTEN *et al.*, 2002).

5.2 Efeito dos componentes da saliva artificial na estrutura do SPCL selecionados

5.2.1 Microscopia de luz polarizada

Na Figura 12 estão dispostas as fotomicrografias obtidas por MLP das formulações FA, FQ, FP e FPQ acrescidas ou não de saliva.

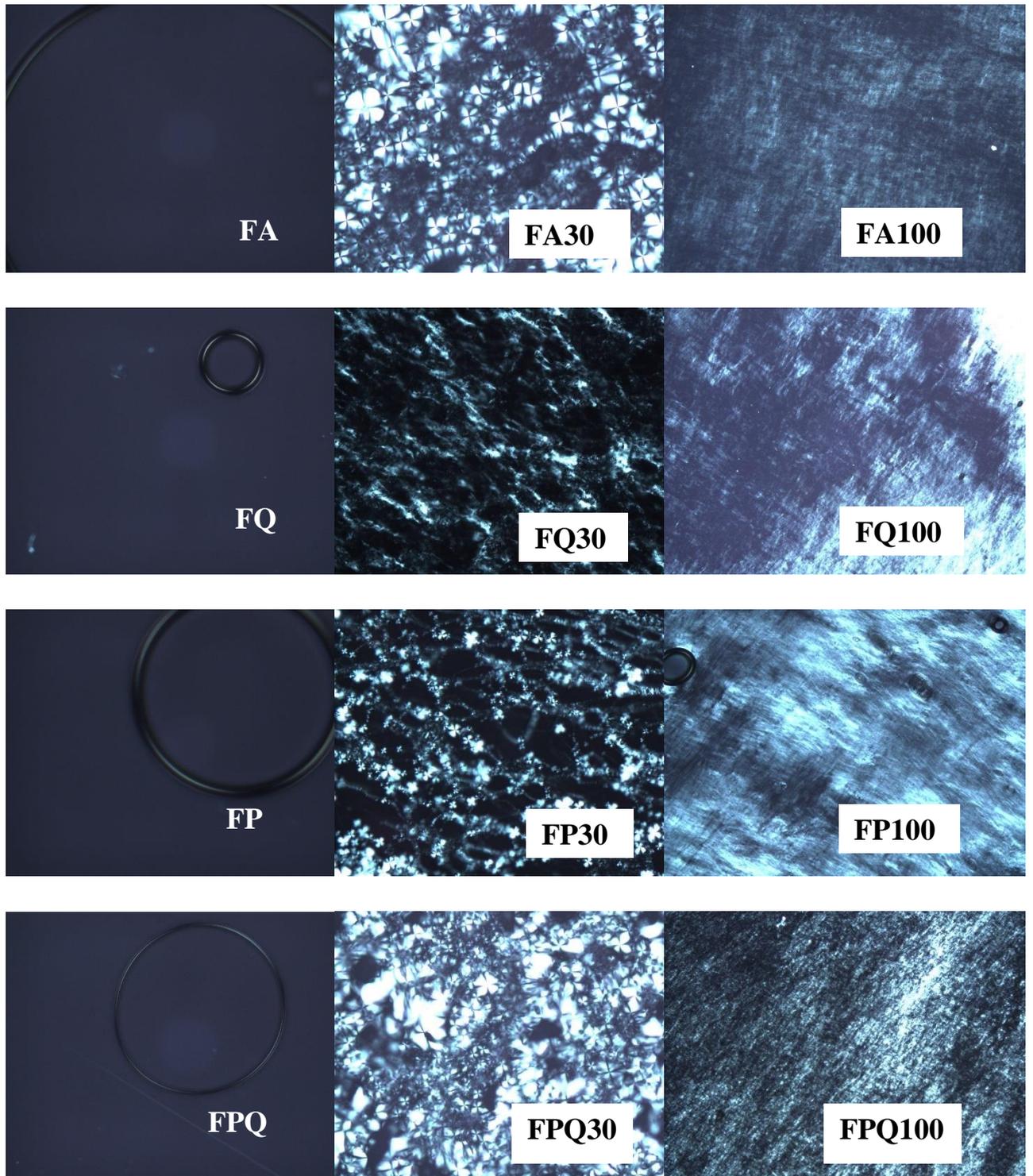


Figura 12. Fotomicrografias das formulações FA, FA30, FA100, FQ, FQ30, FQ100, FP, FP30, FP100 e FPQ, FPQ30 e FPQ100. Aumento 40 x.

Verificou-se que amostras FA, FQ, FP e FPQ são isotrópicas, ou seja, sob o plano de luz polarizada não desviaram a luz, sugerindo a formação de sistema microemulsionado, uma

vez que são fluidas e a viscosidade aparente da mesofase líquido-cristalina cúbica é extremamente elevada (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2001).

Ao se adicionar 30% de saliva nas formulações FA, FQ, FP e FPQ, respectivamente formando as formulações FA30, FQ30, FP30, FPQ30, ocorreu a formação de estruturas em forma de cruz de malta características de mesofase líquido cristalina lamelar, sugerindo a formação de uma estrutura mais organizada.

Ao se adicionar 100% de saliva nas formulações FA, FQ, FP e FPQ, formando respectivamente as formulações FA100, FQ100, FP100 e FPQ100, ocorreu a formação de estruturas estriadas características de mesofase líquido cristalina hexagonal, sugerindo o aumento da organização estrutural do sistema.

Carvalho *et al.* (2013) desenvolveram um sistema precursor de cristal líquido (SPCL) de baixa viscosidade para administração nasal de zidovudina composto por Procetyl, ácido oleico e água (55, 30, 15% m/m). O SPCL ao entrar em contato com 100% de muco nasal artificial transformou-se em uma mesofase líquido cristalina lamelar que pode formar uma matriz mucoadesiva e assim promover uma melhor absorção nasal do AZT, tornando-se uma interessante alternativa para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida.

Salmazi *et al.* (2015) desenvolveram um SPCL de baixa viscosidade consistindo de 40% de Procetyl, 50% de ácido oleico e 10% de dispersão de quitosana a 0,5% com adição de 16% de poloxamer para administração vaginal de curcumina para o tratamento de candidíase vaginal (CV), pois a adição de 100% de muco vaginal artificial no SPCL formou um sistema líquido cristalino lamelar de alta viscosidade com alta mucoadesão pela mucosa vaginal. Além disso, o SPCL mostrou ser dezesseis vezes mais potente contra a linhagem padrão de *Candida albicans* quando comparado com a curcumina livre.

Dos Santos Ramos *et al.* (2016) desenvolveram um SPCL formado por 40% de ácido oleico, 40% de Procetyl e 20% de dispersão bipolimérica composta por 0,5% Polycarbophil[®] (PP) e 0,5% Carbopol C974P[®] para a incorporação de extrato hidroetanólico de *Syngonanthus nitens* Bong (Rhul.) para avaliar sua ação no tratamento da candidíase vulvovaginal por meio de um estudo *in vivo* utilizando ratas Wistar. Os resultados foram promissores, pois mostraram que esse SPCL se transformou em uma mesofase líquido cristalina lamelar com a adição de 100% de muco vaginal artificial e foi eficaz em apenas dois dias após o início do tratamento, sendo mais eficaz do que o extrato em solução e a anfotericina B.

Essa transição de mesofase é devido ao fenômeno de solvatação da cabeça polar do tensoativo Procetyl[®] AWS pela adição de água, levando ao aumento da curvatura e do volume da região polar, gerando estruturas hexagonais por causa do maior empacotamento. Essas

estruturas mais empacotadas têm o movimento lateral e translacional mais restrito, resultando em uma maior viscosidade (MALMSTEN, 2002; MEZZENGA, 2012).

Portanto, esses resultados parecem compatíveis com o objetivo proposto já que a formulação escolhida de cada diagrama conseguiu se comportar como sistema precursor de cristal líquido, pois ao se adicionar quantidades crescentes de saliva, ocorreu a formação de sistemas líquido-cristalinos.

5.2.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Esta técnica detecta o espalhamento dos raios-X em ângulos de θ menor que 10° , que corresponde a distâncias interplanares com dimensões nanométricas, sendo eficaz na caracterização de sistemas formados por tensoativo pela possibilidade de se determinar o tamanho médio e a distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, micelas ou estruturas cristalinas. Além disso, essa técnica permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada (CARVALHO, 2012; MANAIA, 2012).

Em sistemas do tipo micelas e microemulsões, as curvas de SAXS apresentam uma banda ou pico amplo, associado com a baixa correlação espacial tridimensional. Já sistemas cristalinos com orientação aleatória podem agregar formando domínios com estruturas uni, bi e tridimensionais (BEAUCAGE *et al.*, 1995).

A intensidade $I(q)$ produzida exhibe forma máxima (ou picos de Bragg) para valores específicos do vetor de espalhamento q . Se a curva de espalhamento contiver vários picos, a correlação da distância entre suas posições no eixo q revelam o tipo de estrutura cristalina e permite calcular parâmetros estruturais de rede. A distância (d) entre os vetores de espalhamento é realizada através da Equação 6:

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

A estrutura hexagonal, lamelar e cúbica de cristais líquidos liotrópicos pode ser verificada de acordo com a posição dos picos de difração no eixo do vetor de espalhamento q . Para estruturas lamelares, a posição relativa dos picos (em relação ao primeiro pico mais intenso) geralmente obedece à relação $1 \div 2 \div 3 \dots$, enquanto que, para estruturas hexagonais a

relação esperada é $1 \div 3 \div 2 \div 7 \dots$ (HOLMQVIST *et al.*, 1997). Já para os cristais líquidos de fase cúbica correlacionam-se os valores $1,41 \div 1,73 \div 2,82 \div 3$ (YARIV *et al.*, 2010).

Portanto, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos pela microscopia de luz polarizada, as medidas de SAXS foram realizadas, podendo assim fornecer resultados mais precisos sobre a nanoestrutura das formulações.

A partir dos gráficos da Figura 13 e dos valores obtidos na Tabela 3 foi possível identificar quais foram as mesofases das estruturas líquido-cristalinas presentes.

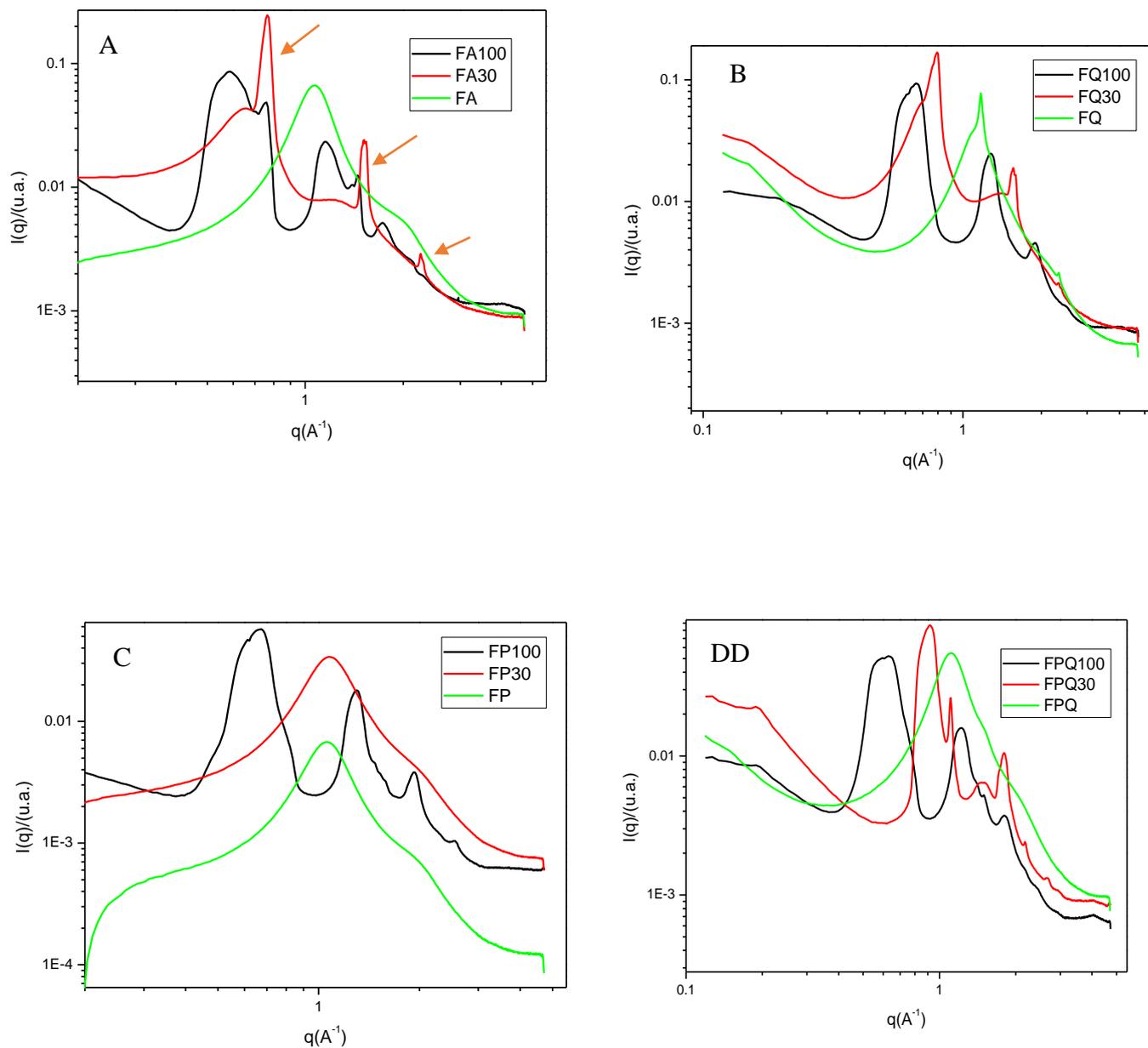


Figura 13. Avaliação estrutural das formulações por SAXS: a) FA, FA30 e FA100; b) FQ, FQ30 e FQ100; c) FP, FP30 e FP100; d) FPQ, FPQ30 e FPQ100. As setas indicam os picos de Bragg.

Tabela 3. Valores de q_{\max} (Å) e razão entre as distâncias interplanares para as formulações.

Formulação	$q_{\max 1}$	$q_{\max 2}$	$q_{\max 3}$	d_1/d_2	d_1/d_3	Estrutura	d (nm)
FA	1,06	-	-	-	-	Microemulsão	5,90
FA30	0,76	1,52	2,28	2	3	Lamelar	8,26
FA100	0,58	1,15	1,46	2	2,51	Hexagonal	10,82
FQ	1,16	-	-	-	-	Microemulsão	5,41
FQ30	0,79	1,58	2,33	2	3	Lamelar	7,94
FQ100	0,66	1,27	1,90	2	3	Lamelar	9,51
FP	1,05	-	-	-	-	Microemulsão	5,95
FP30	1,06	-	-	-	-	Microemulsão	5,92
FP100	0,66	1,32	1,95	2	3	Lamelar	9,51
FPQ	1,12	-	-	-	-	Microemulsão	5,60
FPQ30	0,93	1,10	1,83	1	2	Lamelar	6,75
FPQ100	0,61	1,21	1,83	2	3	Lamelar	10,29

Nota-se um pico alargado nas curvas de SAXS das formulações FA, FQ, FP, FP30, FPQ, o que evidencia sistemas micelares ou microemulsionados.

Já a formulação FA100 apresentou a razão 2:2, 51 evidenciando fase hexagonal, que foi apoiado pelas estruturadas estriadas mostradas na fotomicrografia de luz polarizada.

As formulações FA30, FPQ 30 e FQ 30 demonstraram uma correlação entre as distâncias dos objetos espalhadores $d_1/d_2 = 2$ e $d_1/d_3 = 3$, mostrando uma periodicidade equivalente a um arranjo líquido cristalino de fase lamelar, confirmada pela presença de “cruzes de malta” na MLP.

As formulações FQ100, FP100, FPQ100 também mostraram uma correlação 2:3 que é característico de mesofase lamelar. Essas amostras provavelmente podem estar numa região de transição de fase uma vez que foram evidenciadas estruturas estriadas quando observadas pelo MLP, o que confirma ideia de que os sistemas microemulsionados e sistemas com arranjos líquido-cristalinos são sistemas complexos e necessitam de mais de uma técnica para caracterizar suas estruturas (EFRAT *et al.*, 2007; OYAFUSO *et al.*, 2015).

Para sistemas micelares, d é a separação entre fileiras de micelas de haste adjacentes. Para as fases lamelares, d é o espaçamento entre duas camadas adjacentes. Para as fases hexagonais, d é a distância entre fileiras adjacentes de cilindros na estrutura hexagonal. Os valores da distância entre planos (d) indicados na Tabela 3 estão compreendidos entre 5 nm e 10 nm mostrando que as estruturas das formulações obtidas estão em escala nanométrica (CHO *et al.*, 2004).

5.2.3 Análises reológicas

5.2.3.1 Análise reológica contínua

A análise reológica contínua estuda o comportamento de fluxo do material quando submetido a uma tensão, estabelecendo, assim, uma relação entre a microestrutura e o comportamento macroscópico do material (SAVIC *et al.*, 2011).

Desse modo, a análise reológica contínua é um método muito utilizado na caracterização de sistemas de liberação, pois avalia a facilidade com que o material escoar de um frasco, o bombeamento de um produto do equipamento em um processo industrial, o espalhamento de um creme ou loção sobre a pele e a passagem do produto pelo orifício de uma agulha (PESTANA *et al.*, 2009).

Este comportamento de fluxo do material é dado através da análise de um gráfico, chamado curva de fluxo, que correlaciona a tensão de cisalhamento com a taxa de cisalhamento. Essas curvas de fluxo são formadas por duas curvas, uma curva ascendente que indica o comportamento de fluxo do material quando se aumenta a taxa de cisalhamento sobre ele, e uma curva descendente que indica o comportamento de fluxo desse material quando se diminui a taxa de cisalhamento (ISAAC, 2008).

A partir da curva ascendente, pode-se classificar o comportamento de fluxo em dois tipos: Newtoniano ou não Newtoniano. O fluxo não Newtoniano pode ser ainda classificado em pseudoplástico, dilatante ou plástico. Já a partir da curva descendente, pode-se classificar o material em tixotrópico ou reopético (SCHRAMM, 2006).

Assim, o fluxo classificado como Newtoniano é aquele em que a curva de fluxo é formada por uma reta que passa pela origem, onde seus valores de tensão e taxa de cisalhamento são constantes. Isso significa que a viscosidade não é afetada por mudanças na

taxa de cisalhamento, portanto a viscosidade desse tipo de fluxo é constante (SCHRAMM, 2006).

O fluxo pseudoplástico ocorre em materiais que sofrem diminuição na viscosidade quando a taxa de cisalhamento passa de níveis baixos para níveis mais altos. O aumento da taxa de cisalhamento orienta partículas rígidas na direção do fluxo, gerando *shear thinning*, ou seja, afinamento por cisalhamento (SAVIC *et al.*, 2011).

Já o fluxo plástico apresenta as mesmas características do fluxo pseudoplástico, porém, com uma tensão limite de escoamento, conhecida também por *yield stress*, sendo necessário superá-la para que o material comece a fluir. Portanto, esses materiais necessitam de uma força externa maior que supere sua força de reticulação interna para fluir. Por fim, o fluxo dilatante é aquele que aumenta sua viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (MAZZARINO *et al.* 2007).

Os materiais podem ser classificados ainda como tixotrópico ou reopético quando esses apresentarem a capacidade de se reestruturar, ou seja, recuperar sua estrutura inicial quando a taxa de cisalhamento for diminuída (ISAAC *et al.*, 2008).

Materiais com comportamento de fluxo tixotrópico são caracterizados pela diminuição da viscosidade durante o aumento da taxa de cisalhamento, e quando essa taxa é diminuída, a viscosidade volta a aumentar. Graficamente, a curva descendente pode se sobrepor à curva ascendente, mostrando que o material se recupera rapidamente, classificado como tixotrópico tempo independente, ou a curva descende pode voltar por baixo da curva ascendente, no sentido horário, formando uma área de histerese, que indica que a viscosidade do material aumenta mais lentamente do que diminui, inicialmente, com o *shear thinning*, sendo classificado como tixotrópico tempo dependente (FRESNO *et al.*, 2002).

Por outro lado, materiais com comportamento de fluxo reopético são caracterizados pelo aumento da viscosidade durante o cisalhamento, e quando esse cisalhamento for diminuído, o material recuperará sua forma original, ou seja, de baixa viscosidade. Na curva de fluxo de um sistema com reopexia a curva descendente volta acima da curva ascendente, no sentido anti-horário da curva (SCHRAMM, 2006).

A relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento de todas as formulações está ilustrada na Figura 14.

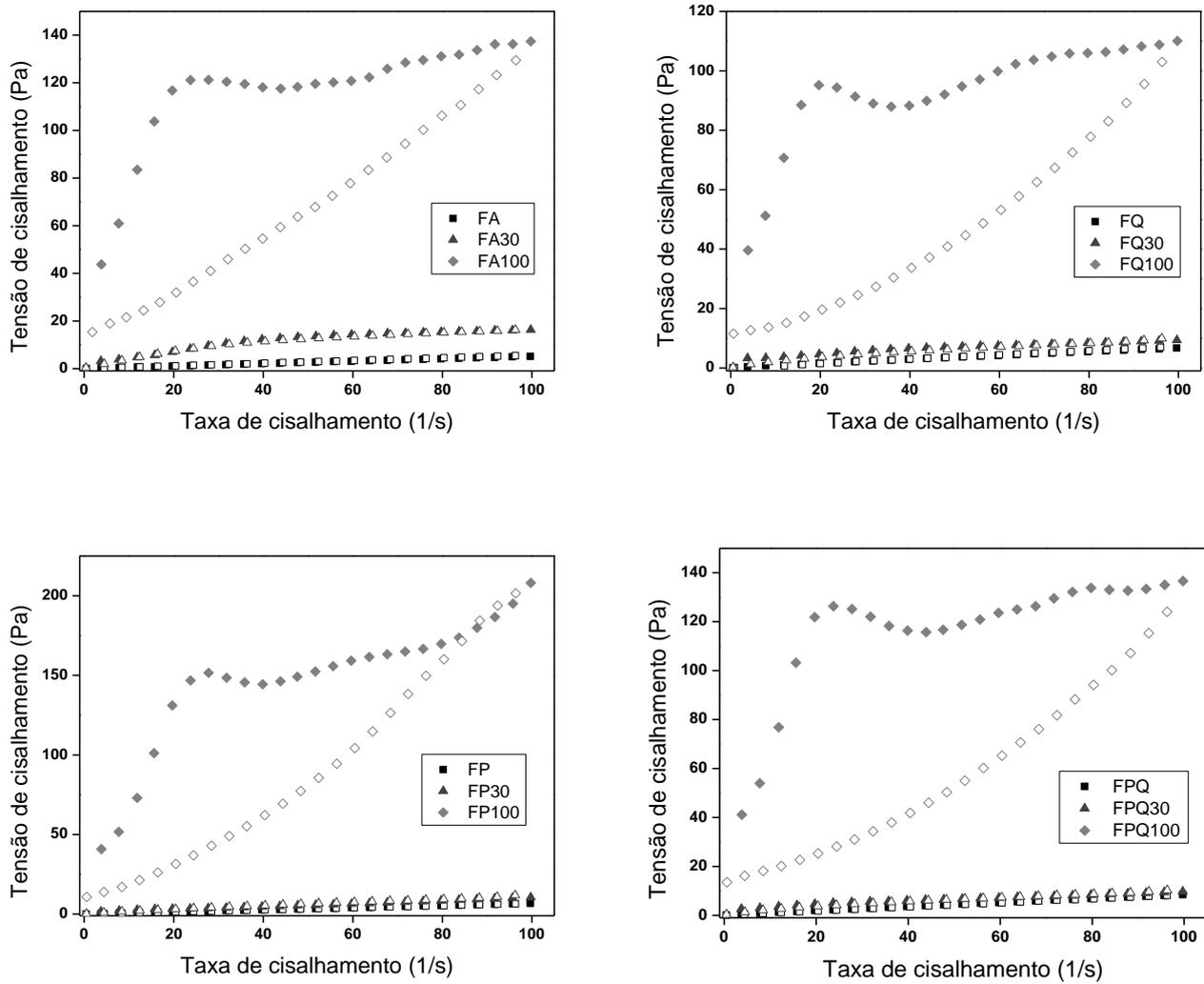


Figura 14. Reogramas das formulações. Símbolos cheios curva ascendente e símbolos vazios curva descendente.

Os dados de valores do índice de consistência (K) e comportamento de fluxo (n), obtidos pela Equação 1, estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores do índice de consistência (K) e do comportamento de fluxo (n) das formulações estudadas.

Formulação	K	n
FA	0.052 ± 0.010	1.005 ± 0.010
FA 30	1.881 ± 0.100	0.468 ± 0.024
FA 100	48.194 ± 2.961	0.228 ± 0.064
FQ	0.130 ± 0.019	0.905 ± 0.023
FQ 30	1.565 ± 0.452	0.390 ± 0.126
FQ 100	36.739 ± 2.630	0.241 ± 0.027
FP	0.063 ± 0.018	1.013 ± 0.028
FP 30	0.248 ± 0.042	0.862 ± 0.051
FP100	36.244 ± 1.759	0.371 ± 0.095
FPQ	0.128 ± 0.016	0.909 ± 0.022
FPQ 30	1.418 ± 0.160	0.412 ± 0.092
FPQ 100	60.424 ± 3.418	0.276 ± 0.064

Foi considerado o planejamento estatístico de análise por médias e intervalos de confiança. De acordo com a Figura 15, somente os índices de comportamento de fluxo (n) médio das formulações FA e FP, na ausência de saliva, e seus IC95% passaram pelo valor padrão 1. As demais formulações mostraram valores de n inferior a 1.

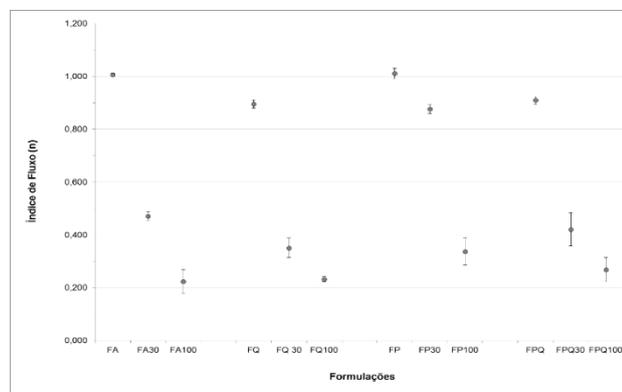


Figura 15. Valores médios de índice de fluxo de acordo com a formulação utilizada e respectivos IC95%.

Portanto, foi constatado que apenas as formulações FA e FP apresentaram comportamento Newtoniano e que as demais formulações apresentaram comportamento não Newtoniano pseudoplástico. Além disso, ficou claramente demonstrado que a adição de saliva diminuiu os valores do índice de comportamento de fluxo gradativamente, aumentando a pseudoplasticidade das formulações enquanto que a diferença dos polímeros não interferiu nesse comportamento.

O comportamento pseudoplástico é uma propriedade desejável para as formulações mucoadesivas destinadas para a administração de fármacos por via bucal, pois formulações com esse comportamento fluem na presença de uma força externa devido ao alinhamento de suas moléculas em direção ao fluido, liberando o solvente que tinha sido previamente aprisionado nos entrelaçamentos moleculares e assim diminuindo a sua resistência, o que favorece a espalhabilidade da formulação na mucosa bucal. No entanto, quando essa força cessa, a formulação recupera a sua estruturação inicial, ou seja, sua viscosidade alta, retendo-se por mais tempo na mucosa bucal, o que pode aumentar a biodisponibilidade do fármaco e consequentemente seu efeito local (CID *et al.*, 2011; GALES *et al.*, 2013; GRACIANO *et al.* 2015).

De acordo com a Tabela 6, nota-se que de uma forma geral, a adição de 30% e de 100% de saliva resultou em aumento nos valores médios do índice de consistência, apesar do aumento parecer mais expressivo com a adição de 100%. A variabilidade observada nos grupos foi considerada adequada, com exceção dos grupos FA, FQ30 e FP, nos quais o coeficiente de variação ultrapassou os 20% desejados.

Tabela 5. Principais estatísticas descritivas para a variável índice de consistência (K) segundo a formulação. Formulação: FA- água; FQ- quitosana; FP- polietilenoimina; FPQ- polietilenoimina/quitosana; 0, 30 e 100 – concentração de saliva.

Estatística	Formulação/Saliva											
	FA	FA30	FA100	FQ	FQ 30	FQ100	FP	FP30	FP100	FPQ	FPQ 30	FPQ100
Média	0,052	1,881	48,194	0,130	1,565	36,739	0,063	0,248	36,244	0,128	1,418	60,424
Desvio-padrão	0,011	0,106	3,121	0,020	0,477	2,773	0,018	0,042	1,759	0,016	0,161	3,419
Mediana	0,051	1,885	47,666	0,132	1,372	36,499	0,063	0,240	36,626	0,133	1,399	59,755
Mínimo	0,036	1,701	43,891	0,102	1,021	32,095	0,035	0,182	32,259	0,101	1,206	56,421
Máximo	0,073	2,053	54,193	0,158	2,473	41,389	0,105	0,316	38,171	0,144	1,719	66,980

Por se tratar de um delineamento com duas variáveis independentes, a análise inferencial pretendida seria a análise de variância a dois fatores independentes. O pressuposto de normalidade dos dados foi atendido em todos os grupos ($p \geq 0,051$) de acordo com o teste de Shapiro-Wilk e os dados apresentaram heterocedasticidade de acordo com o teste de Levene ($p < 0,001$). Dessa forma, a abordagem não paramétrica poderia ser indicada. No entanto, por se tratar de um experimento com grupos balanceados e de um delineamento em blocos que acarreta em um tamanho amostral suficientemente grande, optou-se por utilizar a análise paramétrica dos dados, tendo em vista que esse tipo de análise é robusto à violação

dos pressupostos no cenário apresentado (MAROCO, 2010). Assim, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a dois critérios (formulação e saliva) seguida do pós-teste de Games Howell. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Assim, de acordo com a ANOVA mostrada na Tabela 6, ambos os fatores formulação e saliva possuem efeito altamente significativo no índice de consistência, bem como a interação entre eles. Pode-se notar que o efeito da saliva, da formulação e a interação entre eles foi alto (η^2_p), sugerindo que na prática, todos possuem alto impacto na alteração do índice de consistência.

Tabela 6. Sumário da Análise de Variância a dois fatores.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η^2_p	π
Formulação	53345,256	2,000	26672,628	9854,438	<0,001	0,995	1,000
Saliva	1387,195	3,000	462,398	170,837	<0,001	0,826	1,000
Interação	2552,138	6,000	425,356	157,152	<0,001	0,897	1,000
Resíduo	292,319	108,000	2,707				
TOTAL	86744,551	120,000					

Uma vez que houve significância na interação dos fatores, as comparações múltiplas foram realizadas nos cruzamentos dos grupos e o resultado está na Tabela 7.

Tabela 7. Valores médios e desvios-padrão obtidos para todos os grupos formados a partir do cruzamento das variáveis formulação e saliva. Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha correspondem à medias com diferença não significativa ($p \geq 0,051$) de acordo com o teste de Games-Howell.

Saliva	Formulação				TOTAL
	FA	FQ	FP	FPQ	
0	0,052 ± 0,011 ^{Aa}	0,130 ± 0,020 ^{Ab}	0,063 ± 0,018 ^{Aa}	0,128 ± 0,016 ^{Ac}	0,093 ± 0,040
30	1,881 ± 0,106 ^{Ba}	1,565 ± 0,477 ^{Bab}	0,248 ± 0,042 ^{Bc}	1,418 ± 0,161 ^{Bb}	1,278 ± 0,673
100	48,194 ± 3,121 ^{Ca}	36,739 ± 2,773 ^{Cb}	36,244 ± 1,759 ^{Cb}	60,424 ± 3,419 ^{Cc}	45,400 ± 10,395
TOTAL	16,709 ± 22,724	12,811 ± 17,290	12,185 ± 17,331	20,657 ± 28,669	15,590 ± 21,996

Os valores de K foram dependentes tanto da presença de saliva quanto da fase aquosa utilizada. Dessa forma, o aumento gradativo da concentração de saliva aumentou gradativamente a consistência de todas as formulações de forma significativa.

Isso se deve ao fato de que a água presente na saliva provocou a solvatação do tensoativo, aumentando seu fator do empacotamento, levando à formação de estruturas mais

organizadas e, conseqüentemente aumentando a consistência da formulação (MALMSTEN, 2002; MEZZENGA, 2012).

Já a presença concomitantemente dos polímeros quitosana e polietilenoimina (FPQ) na fase aquosa resultou nos maiores valores de K, sendo que a formulação FPQ com 100% de saliva (FPQ100) aumentou significativamente em 1,64 vezes o índice de consistência em relação à formulação FQ100.

O aumento do índice de consistência com a incorporação de polímeros já foi relatado em outros estudos reológicos contínuos de formulações para uso bucal. Isso pode ser explicado considerando as numerosas ligações intermoleculares que ocorrem entre as cadeias poliméricas responsáveis pela viscosidade e espessamento da formulação (PERIOLI, 2007; CID *et al.*, 2012, CALIXTO *et al.*, 2016).

Assim, esse aumento do índice de consistência mostrada pela formulação FPQ100 pode ser devido a uma interação iônica maior entre as cargas positivas dos polímeros e a carga negativa da saliva formando um gel de quitosana e polietilenoimina mais reticulado, e assim aumentando a consistência das formulações estudadas.

5.2.3.2 Análise reológica oscilatória

Na análise reológica oscilatória, a tensão de cisalhamento varia como uma onda senoidal, e a relação entre ela e a deformação resultante oferece informações sobre a viscoelasticidade da amostra. Desse modo, a análise reológica oscilatória estuda as propriedades viscoelásticas das formulações, ou seja, se a formulação tende ser mais viscosa ou mais elástica, o que fornece informações sobre a natureza estrutural do sistema, implicando diretamente na estabilidade da formulação.

Essa informação é obtida pela análise dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') obtidos nesse ensaio. O módulo elástico, G' , é denominado módulo de armazenagem, representando tanto a energia armazenada durante a deformação quando a tensão aumenta, quanto a energia liberada quando a tensão é relaxada. Já o módulo viscoso G'' é o elemento viscoso que não pode armazenar energia, pois a tensão aplicada se dissipa na forma de deformação irreversível (PÈNZES *et al.* 2004).

Desse modo, a magnitude destes módulos é uma indicação qualitativa da estrutura do sistema, por exemplo, se $G' \gg G''$, pode-se sugerir que o sistema está interligado quimicamente, ou se $G' > G''$ o sistema está estruturado por ligações secundárias, e se $G' \leq G''$, diz-se que as moléculas do sistema estão ligadas apenas por interações físicas (CEULEMANS *et al.* 2002).

Portanto, a fim de se estudar a evolução temporal dos módulos de armazenagem (G') e perda (G'') em função da frequência aplicada, foi realizada a análise oscilatória das formulações, conforme ilustrado na Figura 16.

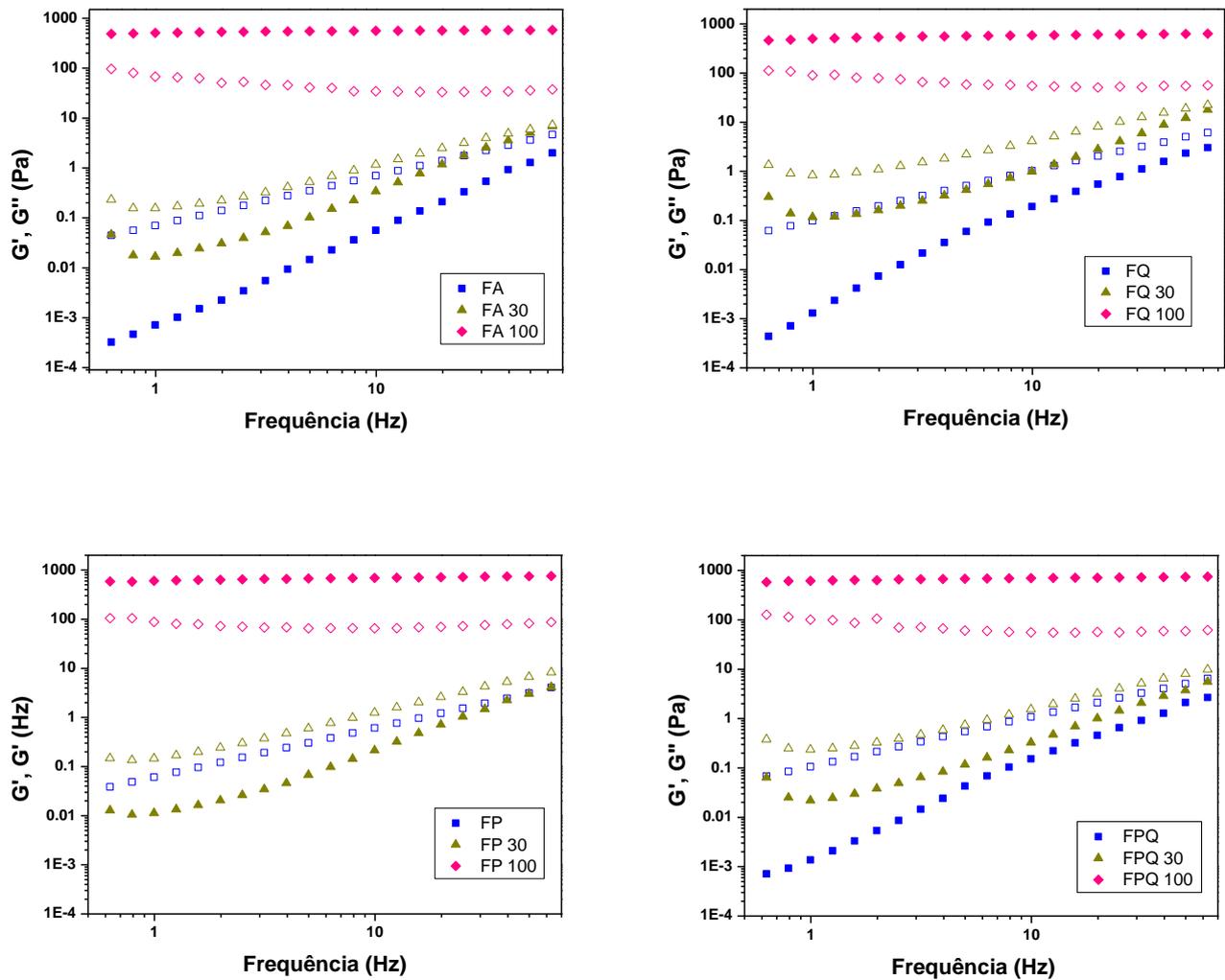


Figura 16. Variação do módulo de armazenagem G' (símbolo cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência para todas as formulações.

De acordo com a Tabela 8, pode-se notar que, de uma forma geral, a adição de 30% e 100% de saliva em todas as formulações resultou em aumento nos valores médios do módulo de armazenamento G' , sendo que um aumento muito expressivo foi observado com a concentração de 100% de saliva em todas as formulações. A variabilidade observada nos grupos foi considerada adequada, com exceção dos grupos FQ30 e FPQ30, nos quais o coeficiente de variação ultrapassou os 20% desejados.

Tabela 8. Principais estatísticas descritivas para o módulo de armazenamento G' segundo a formulação.

Estatística	Formulação/Saliva											
	FA	FA30	FA100	FQ	FQ 30	FQ100	FP	FP30	FP100	FPQ	FPQ 30	FPQ100
Média	0,280	1,095	564,963	0,492	2,581	549,844	0,294	0,675	647,953	0,376	0,847	700,056
Desvio-padrão	0,017	0,143	18,289	0,032	0,905	13,640	0,012	0,129	7,124	0,067	0,213	9,927
Mediana	0,277	1,081	564,748	0,500	2,966	545,671	0,295	0,633	645,631	0,401	0,828	697,886
Mínimo	0,248	0,923	542,581	0,450	1,138	526,991	0,273	0,547	640,433	0,279	0,600	686,267
Máximo	0,303	1,299	591,700	0,556	3,570	573,367	0,311	0,908	660,720	0,467	1,304	714,533

Por se tratar de um delineamento com duas variáveis independentes, a análise inferencial pretendida seria a análise de variância a dois fatores independentes. O pressuposto de normalidade dos dados foi atendido em todos os grupos ($p \geq 0,075$) de acordo com o teste de Shapiro-Wilk e os dados apresentaram heterocedasticidade de acordo com o teste de Levene ($p < 0,001$). Dessa forma, a abordagem não paramétrica poderia ser indicada. No entanto, por se tratar de um experimento com grupos balanceados e de um delineamento em blocos que acarreta em um tamanho amostral suficientemente grande, optou-se por utilizar a análise paramétrica dos dados, tendo em vista que esse tipo de análise é robusta à violação dos pressupostos no cenário apresentado (MAROCO J., 2010).

Assim, os dados foram submetidos à análise de variância a dois critérios (formulação e saliva) seguida do pós-teste de Games Howell. O nível de significância adotado foi de 0,05.

De acordo com a ANOVA descrita na Tabela 9, ambos os fatores formulação e saliva possuem efeito altamente significativo no módulo de armazenamento G', assim como a interação entre eles. Pode-se notar que o efeito da saliva, da formulação e a interação entre eles foi alto (η^2_p), sugerindo que na prática, todos possuem alto impacto prático na alteração do módulo G, embora o efeito da saliva tenha se mostrado o maior entre eles.

Tabela 9. Sumário da Análise de Variância a dois fatores.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η^2_p	π
Formulação	49315,192	3,000	16438,397	294,103	<0,001	0,891	1,000
Saliva	10081884,833	2,000	5040942,417	90188,707	<0,001	0,999	1,000
Interação	101381,944	6,000	16896,991	302,308	<0,001	0,944	1,000
Resíduo	6036,474	108,000	55,893				
TOTAL	15320457,613	120,000					

Uma vez que houve significância na interação dos fatores, as comparações múltiplas foram realizadas nos cruzamentos dos grupos e o resultado está na Tabela 11.

Tabela 10. Valores médios e desvios-padrão obtidos para todos os grupos formados a partir do cruzamento das variáveis formulação e saliva. Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha correspondem à medias com diferença não significativa ($p \geq 0,079$) de acordo com o teste de Games-Howell.

Saliva	Formulação					TOTAL
	FA	FQ	FP	FPQ		
0	0,280 ± 0,017 ^{Aa}	0,492 ± 0,032 ^{Ab}	0,294 ± 0,012 ^{Aac}	0,376 ± 0,067 ^{Ac}		0,360 ± 0,093
30	1,095 ± 0,143 ^{Ba}	2,581 ± 0,905 ^{Bb}	0,675 ± 0,129 ^{Bc}	0,847 ± 0,213 ^{Bac}		1,299 ± 0,890
100	564,963 ± 18,289 ^{Ca}	549,844 ± 13,640 ^{Ca}	647,953 ± 7,124 ^{Cb}	700,056 ± 9,927 ^{Cc}		615,704 ± 63,388
TOTAL	188,779 ± 270,741	184,306 ± 263,005	216,307 ± 310,463	233,759 ± 335,404		205,788 ± 293,324

Para todas as formulações, o aumento na concentração de saliva promoveu um aumento nos valores médios de G' considerado significativo estatisticamente ($p \leq 0,001$). Na ausência de saliva ou com saliva a 30%, a formulação FPQ mostrou valores de G' significativamente maiores que as demais formulações. Na presença de saliva a 100%, a formulação FPQ mostrou os maiores valores do módulo G', seguida da FP.

De acordo com a Tabela 11, pode-se notar que de uma forma geral, a adição de 30% e 100% de saliva resultou em aumento nos valores médios do módulo de perda G'', sendo que um aumento muito expressivo foi observado com a concentração de 100% em todas as formulações. A variabilidade observada nos grupos foi considerada adequada, com exceção dos grupos FQ30 e FP30, nos quais o coeficiente de variação ultrapassou os 20% desejados.

Tabela 11. Principais estatísticas descritivas para o módulo de perda G'' segundo a formulação. Formulação: FA- água; FQ- quitosana; FP- polietilenoimina; FPQ- polietilenoimina/quitosana; 0, 30 e 100 – concentração de saliva.

Estatística	Formulação/Saliva											
	FA	FA30	FA100	FQ	FQ 30	FQ100	FP	FP30	FP100	FPQ	FPQ 30	FPQ100
Média	0,957	1,801	46,753	1,507	5,836	61,787	0,878	1,744	70,705	1,374	2,225	69,328
Desvio-padrão	0,144	0,225	3,830	0,202	2,195	6,327	0,037	0,368	5,171	0,197	0,406	4,880
Mediana	0,908	1,755	47,480	1,495	6,527	64,764	0,877	1,650	70,817	1,432	2,127	68,137
Mínimo	0,810	1,579	40,236	1,150	2,777	52,549	0,826	1,310	64,572	0,928	1,773	60,563
Máximo	1,250	2,211	53,808	1,770	9,916	68,591	0,955	2,702	77,208	1,640	3,149	77,137

Por se tratar de um delineamento com duas variáveis independentes, a análise inferencial pretendida seria a análise de variância a dois fatores independentes. O pressuposto de normalidade dos dados foi atendido em todos os grupos ($p \geq 0,058$) de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, com exceção do grupo FP 30 ($p = 0,02$) e os dados apresentaram heterocedasticidade de acordo com o teste de Levene ($p < 0,001$). Dessa forma, a abordagem não-paramétrica poderia ser indicada. No entanto, por se tratar de um experimento com grupos balanceados e de um delineamento em blocos que acarreta em um tamanho amostral suficientemente grande, optou-se por utilizar a análise paramétrica dos dados, tendo em vista que esse tipo de análise é robusta à violação dos pressupostos no cenário apresentado (MAROCO, 2010). Assim, os dados foram submetidos à análise de variância a dois critérios (formulação e saliva), seguida do pós-teste de Games Howell. O nível de significância adotado foi de 0,05.

De acordo com a ANOVA mostrada na Tabela 13, ambos os fatores formulação e saliva possuem efeito altamente significativo no módulo de perda G'' , assim como a interação entre eles.

Tabela 12. Sumário da Análise de Variância a dois fatores.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η^2_p	π
Formulação	1277,177	3,000	425,726	46,224	<0,001	0,562	1,000
Saliva	96389,565	2,000	48194,782	5232,843	<0,001	0,990	1,000
Interação	2460,815	6,000	410,136	44,531	<0,001	0,712	1,000
Resíduo	994,686	108,000	9,210				
TOTAL	159596,446	120,000					

Pode-se notar que o efeito da saliva foi o mais alto (η^2_p), sugerindo que na prática, este possui alto impacto prático na alteração do módulo G''.

Uma vez que houve significância na interação dos fatores, as comparações múltiplas foram realizadas nos cruzamentos dos grupos e o resultado está na Tabela 13.

Tabela 13. Valores médios e desvios-padrão obtidos para todos os grupos formados a partir do cruzamento das variáveis formulação e saliva. Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha correspondem à medias com diferença não significativa ($p \geq 0,086$) de acordo com o teste de Games-Howell.

Saliva	Formulação					TOTAL
	FA	FQ	FP	FPQ		
0	0,957 ± 0,144 ^{Aa}	1,507 ± 0,202 ^{Ab}	0,878 ± 0,037 ^{Aa}	1,374 ± 0,197 ^{Ab}	1,179 ± 0,311	
30	1,801 ± 0,225 ^{Ba}	5,836 ± 2,195 ^{Bb}	1,744 ± 0,368 ^{Ba}	2,225 ± 0,406 ^{Ba}	2,901 ± 2,043	
100	46,753 ± 3,830 ^{Ca}	61,787 ± 6,327 ^{Cb}	70,705 ± 5,171 ^{Cb}	69,328 ± 4,880 ^{Cb}	62,143 ± 10,820	
TOTAL	16,504 ± 21,863	23,043 ± 28,170	24,442 ± 33,399	24,309 ± 32,494	22,075 ± 29,151	

Para todas as formulações, o aumento na concentração de saliva promoveu aumento nos valores médios de G'' considerado significativo estatisticamente ($p \leq 0,001$). Na ausência de saliva as formulações FA e FP mostraram os menores valores de G'', enquanto que com a saliva a 30%, as formulações FA, FP e FPQ mostraram os menores valores. Na presença de saliva a 100%, as formulações FQ, FP e FPQ mostraram valores do módulo G'' significativamente maiores em comparação a formulação FA, porém iguais entre si.

Portanto, primeiramente, nota-se que todas as formulações sem saliva e todas as formulações com 30% de saliva são mais viscosas do que elásticas ($G'' > G'$). No entanto, a adição de 100% de saliva tornou todas as formulações mais elásticas do que viscosas ($G' > G''$), com estruturas tipo gel altamente organizadas.

Esse comportamento também foi relatado em outros estudos reológicos oscilatórios realizados com sistemas precursores de cristais líquidos, os quais mostraram que após a adição de mucos artificiais, os SPCL viscosos se transformaram em sistemas líquidos cristalinos elásticos. As mesofases líquido cristalinas hexagonais e cúbicas costumam apresentar G' maior que G'' , o que reflete o seu alto grau de organização estrutural (CARVALHO *et al.* 2008; SALMAZI *et al.* 2015; FONSECA –SANTOS *et al.*, 2015; DOS SANTOS RAMOS *et al.* 2016.).

Além disso, nota-se que todas as formulações com a presença concomitantemente dos polímeros quitosana e polietilenoimina (FPQ, FPQ30 e FPQ100) apresentaram os maiores valores de G' e G'' , indicando novamente que a combinação desses polímeros como fase aquosa conseguiu formar um sistema com estruturas cristalinas mais fortes. Este comportamento pode ser diretamente relacionado ao aumento do emaranhamento dos polímeros, resultando em maior resistência dessas formulações à deformação (KARAVANA *et al.*, 2009).

Considerando a aplicação bucal proposta para essas formulações, tem sido relatado que a elasticidade é uma propriedade importante para garantir resistência à deformação e boa retenção das formulações dentro da mucosa bucal (NAFEE *et al.*, 2003; PERIOLI *et al.*, 2008; AMASYA *et al.*, 2012; PANOMSUK *et al.*, 2016). Nesse sentido, o uso de formulações em estudo parece ser apropriado.

5.2.4 Análise do Perfil de Textura

A análise do perfil de textura das formulações revela as propriedades mecânicas das formulações, tais como, dureza, compressibilidade, aditividade e coesão (CALIXTO *et al.*, 2015; CINTRA *et al.*, 2016).

O estudo desses parâmetros se tornou uma ferramenta muito útil no desenvolvimento de sistemas farmacêuticos, pois consegue avaliar os efeitos das tensões encontrados em condições fisiológicas, além de avaliar as características estruturais das formulações (JONES, 1997; SENYIGIT, 2010), o que influencia diretamente no desempenho clínico da formulação.

Desse modo, essa técnica é capaz de avaliar a dureza, que é a resistência máxima à deformação compressional, e a compressibilidade, que é o trabalho necessário para comprimir a formulação. Portanto, dureza e compressibilidade mostram, respectivamente, a facilidade de aplicação e a facilidade de espalhamento da formulação sobre a superfície biológica a ser tratada (JONES *et al.*, 1997; SENYIGIT *et al.* 2010, CARVALHO, 2012).

Além desses dois parâmetros, por meio desse teste, pode-se obter o valor da adesividade que se refere ao trabalho necessário para superar as ligações entre a formulação e a sonda do equipamento. Contudo, esse parâmetro pode envolver a quebra de ligações coesivas dentro da formulação. Desta forma, pode estar relacionado com a coesão da amostra.

Assim quanto maior a adesividade, maior será a coesão da formulação. Logo, esses parâmetros se relacionam com a adesão da formulação pelo substrato biológico e, por conseguinte, com o maior tempo de retenção da formulação no local de aplicação, sendo uma informação útil para aplicação pretendida (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997).

Desta forma, foi realizada a análise de perfil de textura nas formulações que impuseram resistência mecânica ao fluxo, sendo elas as formulações FA100, FP100, FPQ100, FQ100. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 14.

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 0,01 %.

Tabela 14. Propriedades mecânicas das formulações determinadas pela análise de perfil de textura. Cada valor representa a média \pm desvio padrão, à temperatura de 25° C.

Sistemas	Dureza (mN)	Compressibilidade (mN.s)	Adesividade (mN.s)	Coesão
FA 100	14,70 \pm 1,15	108,55 \pm 5,57	82,1 \pm 3,80	0,72 \pm 0,0049
FP 100	15,33 \pm 0,19	111,00 \pm 4,03	78,6 \pm 4,24	0,71 \pm 0,0028
FQ 100	12,69 \pm 2,90	99,07 \pm 16,10	69,5 \pm 2,12	0,70 \pm 0,0082
FPQ 100	14,26 \pm 2,42	105,81 \pm 16,24	67,2 \pm 1,90	0,69 \pm 0,0022
Formulação comercial	7,08 \pm 1,80	49,60 \pm 4,10	35,2 \pm 2,65	0,79 \pm 0,0020

A partir dos dados obtidos, verificou-se que os valores de dureza, compressibilidade e adesividade das formulações desenvolvidas não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si. Jones *et al* (1997) relataram que não foi observado um aumento nos parâmetros mecânicos quando se aumentou a concentração do polímero em géis de celulose devido à elevada força de ligação coesiva nestas amostras, que impede a formação de interações adesivas com a sonda.

Entretanto, todas as formulações foram estaticamente diferentes da formulação comercial. As formulações apresentaram o dobro do valor de dureza e compressibilidade da formulação comercial, o que é interessante porque a compressibilidade é uma medida do

trabalho necessário para quebrar as ligações físicas dentro da formulação, portanto indica que as estruturas das formulações apresentam ligações rígidas entre si, o que pode aumentar a estabilidade física da formulação (MERINO-BOHÓRQUEZ *et al.*, 2015).

A adesividade que é a capacidade de remover a sonda da formulação também foi duas vezes maior para as formulações desenvolvidas; logo, elas apresentam maior poder adesivo, o que é extremamente valioso para o objetivo de aplicação da formulação por via bucal. Bruschi *et al.* (2007) desenvolveram formulações semissólidas para aplicação periodontal com adesividade e relataram que essa característica ajuda a proporcionar melhor retenção da formulação dentro da bolsa periodontal.

5.2.5 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A administração bucal de fármacos é um método não invasivo de administração de fármacos que ganhou muito interesse nos últimos anos, uma vez que a membrana bucal é uma mucosa multicamada e não queratinizada rica em vasos sanguíneos subjacentes e, portanto, apresenta boa permeabilidade aos fármacos através das vias transcelular e paracelular (SHOJAEI *et al.*, 1998; SENEL *et al.*, 2001; GAWAS *et al.*, 2016).

No entanto, o principal desafio relacionado com a administração bucal de fármacos é o tempo de permanência da formulação na mucosa bucal, pois a produção de saliva, a ingestão de alimentos, o movimento da boca e a deglutição podem impedir que as formulações fiquem aderidas à mucosa bucal, levando a uma redução ou ausência de eficácia terapêutica. Assim, um sistema bucal de administração de fármaco ideal deve apresentar mucoadesão pela mucosa bucal com estabilidade suficiente para efetuar o tratamento (VELMURUGAN *et al.*, 2013).

Bio(muco)adesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, pelo menos um de natureza biológica, são mantidos juntos por um período de tempo prolongado, através de forças interfaciais (REPKA *et al.*, 2000).

A principal vantagem da utilização de sistemas bio(muco)adesivos como veículos de fármacos é prolongar o tempo de permanência do fármaco no local de aplicação, o que permite um contato intensificado da formulação com a barreira biológica, diminuindo a frequência da aplicação do produto e, desse modo, aumentando a aderência do paciente à terapia (SMART *et al.*, 2003).

A força de mucoadesão de todas as formulações está ilustrada na Figura 17.

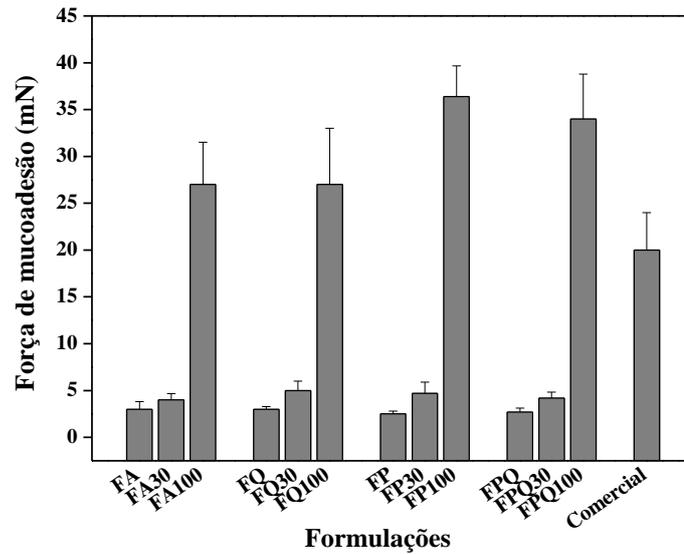


Figura 17. Força de mucoadesão (mN) das formulações.

De acordo com a Tabela 15, pode-se notar que de uma forma geral, a adição de 100% de saliva nas formulações resultou em aumento nos valores médios de mucoadesão. A variabilidade observada nos grupos foi considerada adequada, com exceção dos grupos FA, FQ100 e FP30, nos quais o coeficiente de variação ultrapassou os 20% desejados.

Tabela 15. Principais estatísticas descritivas para a variável mucoadesão segundo a formulação. Formulação: FA- água; FQ- quitosana; FP- polietilenoimina; FPQ- polietilenoimina/quitosana; 0, 30 e 100 – concentração de saliva.

Estatística	Formulação/Saliva											
	FA	FA30	FA100	FQ	FQ 30	FQ100	FP	FP30	FP100	FPQ	FPQ 30	FPQ100
Média	0,003	0,004	0,027	0,003	0,005	0,030	0,002	0,005	0,036	0,003	0,004	0,034
Desvio-padrão	0,001	0,001	0,005	0,000	0,001	0,006	0,000	0,001	0,003	0,000	0,001	0,005
Mediana	0,003	0,004	0,026	0,003	0,006	0,029	0,002	0,004	0,036	0,003	0,004	0,035
Mínimo	0,002	0,003	0,020	0,002	0,004	0,022	0,002	0,004	0,033	0,002	0,003	0,026
Máximo	0,004	0,005	0,036	0,003	0,007	0,039	0,003	0,008	0,043	0,003	0,005	0,041

Por se tratar de um delineamento com duas variáveis independentes, a análise inferencial pretendida seria a análise de variância a dois fatores independentes. O pressuposto de normalidade dos dados foi atendido em 9 grupos ($p \geq 0,089$) de acordo com o teste de Shapiro-Wilk e os dados apresentaram heterocedasticidade de acordo com o teste de Levene ($p < 0,001$). Dessa forma, a abordagem não paramétrica poderia ser indicada. No entanto, por

se tratar de um experimento com grupos balanceados e de um delineamento em blocos que acarreta em um tamanho amostral suficientemente grande, optou-se por utilizar a análise paramétrica dos dados, tendo em vista que esse tipo de análise é robusta à violação dos pressupostos no cenário apresentado (MAROCO, 2010). Assim, os dados foram submetidos à análise de variância a dois critérios (formulação e saliva) seguida do pós-teste de Games Howell. O nível de significância adotado foi de 0,05.

De acordo com a ANOVA mostrada na

Tabela 16, ambos os fatores formulação e saliva possuem efeito altamente significativo na mucoadesão, assim como a interação entre eles.

Tabela 16. Sumário da Análise de Variância a dois fatores.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η^2_p	π
Formulação	0,000	3,000	0,000	7,821	<0,001	0,178	0,987
Saliva	0,021	2,000	0,011	1330,827	<0,001	0,961	1,000
Interação	0,000	6,000	0,000	8,385	<0,001	0,318	1,000
Resíduo	0,001	108,000	0,000				
TOTAL	0,043	120,000					

No entanto, pode-se notar que o efeito da saliva é muito maior que o efeito da formulação (η^2_p), sugerindo que na prática, a concentração de saliva possa ter maior impacto na alteração da mucoadesão do que a diferença de formulação. Uma vez que houve significância na interação dos fatores, as comparações múltiplas foram realizadas nos cruzamentos dos grupos e o resultado está na Tabela 17.

Tabela 17. Valores médios e desvios-padrão obtidos para todos os grupos formados a partir do cruzamento das variáveis formulação e saliva. Letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna e letras minúsculas iguais em uma mesma linha correspondem a medias com diferença não significativa ($p \geq 0,051$) de acordo com o teste de Games-Howell.

Saliva	Formulação								TOTAL
	FA		FQ		FP		FPQ		
0	0,003 ± 0,001	Aab	0,003 ± 0,000	Aa	0,002 ± 0,000	Ab	0,003 ± 0,000	Aab	0,003 ± 0,001
30	0,004 ± 0,001	Aab	0,005 ± 0,001	Ba	0,005 ± 0,001	Ba	0,004 ± 0,001	Ba	0,005 ± 0,001
100	0,027 ± 0,005	Ba	0,030 ± 0,006	Cab	0,036 ± 0,003	Cb	0,034 ± 0,005	Cab	0,032 ± 0,006
TOTAL	0,011 ± 0,011		0,013 ± 0,013		0,015 ± 0,016		0,014 ± 0,015		0,013 ± 0,014

A incorporação de 30% de saliva nas formulações aumentou significativamente o poder mucoadesivo das formulações compostas por polímeros na fase aquosa, enquanto que os diferentes polímeros utilizados não interferiram nesse comportamento.

Já com 100% de saliva incorporada, todas as formulações aumentaram de forma muito significativa o valor de mucoadesão quando se compara com as formulações sem saliva e com 30% de saliva, enquanto que os diferentes polímeros utilizados não interferiram nesse comportamento.

As formulações FQ100, FP100 e FPQ100 obtiveram valores iguais de mucoadesão; no entanto, a formulação FP100 foi a única que apresentou diferença mucoadesiva em relação à formulação apenas com água na fase aquosa (FA100).

Esperava-se que a formulação FPQ100 obtivesse o maior valor de mucoadesão, pois formulações com altos valores de índice de consistência e de módulo de armazenamento (G') tendem a apresentar altos valores de mucoadesão. No entanto, alguns estudos mostram que as formulações com alto grau de rigidez interna podem prejudicar a interação entre a formulação e as proteínas da membrana biológica, uma vez que a interpenetração entre os polímeros e as proteínas da mucosa é um dos fatores chaves da mucoadesão (CARVALHO *et al.*, 2012; SALMAZI *et al.*, 2015).

Entretanto, a FPQ mostrou-se aproximadamente duas vezes mais mucoadesiva do que a formulação comercial para administração de fármacos por via bucal. Dessa forma, a análise estatística do conjunto dos resultados obtidos através de todos os testes de caracterização físico químico mostra que na prática a formulação que apresenta as melhores características para agir como um sistema precursor de cristal líquido para administração bucal de fármaco é a formulação FPQ.

Assim, FPQ foi selecionada para a incorporação do fármaco peptídico CTT1 e do fotossensibilizador azul de metileno para realização dos testes foto e citotóxicos *in vitro* e *in vivo*.

5.2.6 Validação da metodologia analítica para quantificação do CTT1 por espectrofotometria UV-Vis.

A curva analítica do peptídeo CTT1 provou ser linear ao longo do intervalo proposto (20,0-200,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), como mostrado pelos coeficientes de regressão linear (R^2) de 0,9943, demonstrando um ajuste aceitável de dados para a linha de regressão ($y = 0,0037x + 0,0188$), conforme mostrado na Figura 18.

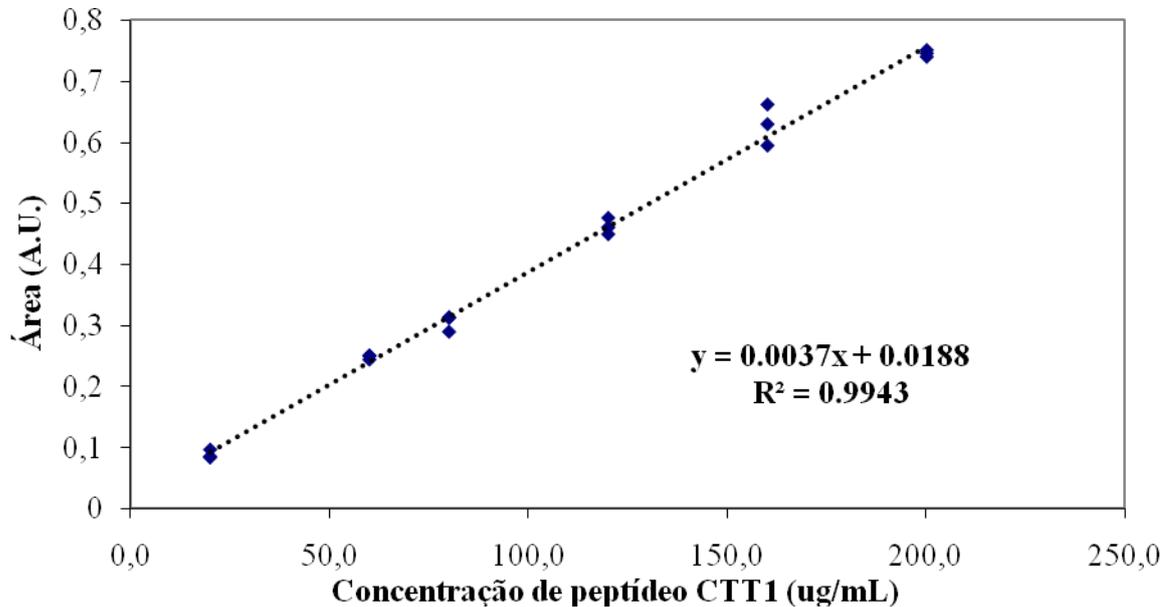


Figura 18. Curva analítica do peptídeo CTT1 no intervalo de concentração entre 20 µg/mL a 200 µg/mL.

A Tabela 18 mostra os resultados de linearidade, obtidos a partir da injeção das seis diluições de CTT1.

Tabela 18. Resultados da linearidade do CTT1.

Concentração de CTT1 (ug/mL)	Absorbância dos picos			Média	DP	DPR (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
20,0	0.0839	0.0967	0.0854	0.0887	0.00699	7.891782
60	0.2440	0.2499	0.2506	0.2482	0.00362	1.460862
80	0.2894	0.3131	0.3119	0.3048	0.01335	4.380013
120	0.4488	0.4599	0.4755	0.4614	0.01340	2.907034
160	0.6608	0.5936	0.6286	0.6277	0.03361	5.354709
200	0.7444	0.7388	0.7496	0.7443	0.00540	0.725712

A sensibilidade do método para o AM foi expressa pela inclinação da curva analítica, e pelos valores LQ e LD de 56,5 ug/mL e 18,6 ug/mL, respectivamente.

A precisão intracorrída e intermediária do método foram avaliadas em três concentrações: 80, 120, 160 µg/mL submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

A Tabela 19 mostra os resultados obtidos.

Tabela 19. Precisão intra-corrída e precisão intermediária do método avaliado em concentrações diferentes de CTT1.

Concentração teórica (ug/mL)	Concentração experimental (ug/mL)		DPR (%)		Exatidão (%)		Valor p
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	
80	77,30 ± 1,47	79,22 ± 3,03	4,38	2,42	96,62	99,03	0,2333
120	119,62 ± 1,45	121,18 ± 3,65	2,90	1,13	99,68	100,99	0,3549
160	160,56 ± 4,00	3,76 ± 2,75	5,35	1,40	102,84	100,34	0,4951

Para repetibilidade, as leituras foram realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista. Os ensaios foram realizados em triplicata. O DPR entre as amostras foi de 1,68%, mostrando assim que o método é preciso.

Para a precisão intermediária, as leituras foram realizadas em dois dias diferentes utilizando o mesmo equipamento. Os ensaios foram realizados em triplicata. O DPR entre as amostras de mesma concentração e realizadas em dias diferentes foi de 2,93%, demonstrando assim que o método é preciso. Os valores de p obtido pelo teste t foram maiores que 0,05, mostrando que as médias de concentrações foram estatisticamente iguais no ensaio da corrida inter dias. O método também se mostrou exato, com uma recuperação média de 96,92 %.

5.2.7 Validação da metodologia analítica para quantificação do azul de metileno por espectrofotometria UV-Vis

A linearidade do método foi determinada pela curva analítica do azul de metileno onde se preparou uma solução padrão dissolvendo 5 mg de azul de metileno em 100 mL de água Milli-Q. A partir dessa solução mãe foram preparadas seis diluições (5 µg/mL, 4 µg/mL, 3 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL), em triplicata, utilizando-se a água Milli-Q como diluente.

A Tabela 20 demonstra os resultados obtidos a partir da injeção das seis diluições de AM.

Tabela 20. Resultados da linearidade do AM.

Concentração de AM (ug/mL)	Absorbância dos picos			Média	DP	DPR (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0,5	0.1128	0.1018	0.106	0.1069	0.005551	5.194300583
1	0.1966	0.1971	0.2078	0.2005	0.006327	3.155574356
2	0.4212	0.4002	0.431	0.4175	0.015736	3.769339096
3	0.5979	0.6009	0.5978	0.5989	0.001762	0.294160309
4	0.8429	0.8518	0.8426	0.8458	0.005227	0.618039561
5	1.0340	1.0200	1.0155	1.0232	0.009648	0.942951988

A Figura 19 demonstra que na curva analítica obteve-se resultado linear, pois se encontrou um coeficiente de correlação (r^2) de 0,9979.

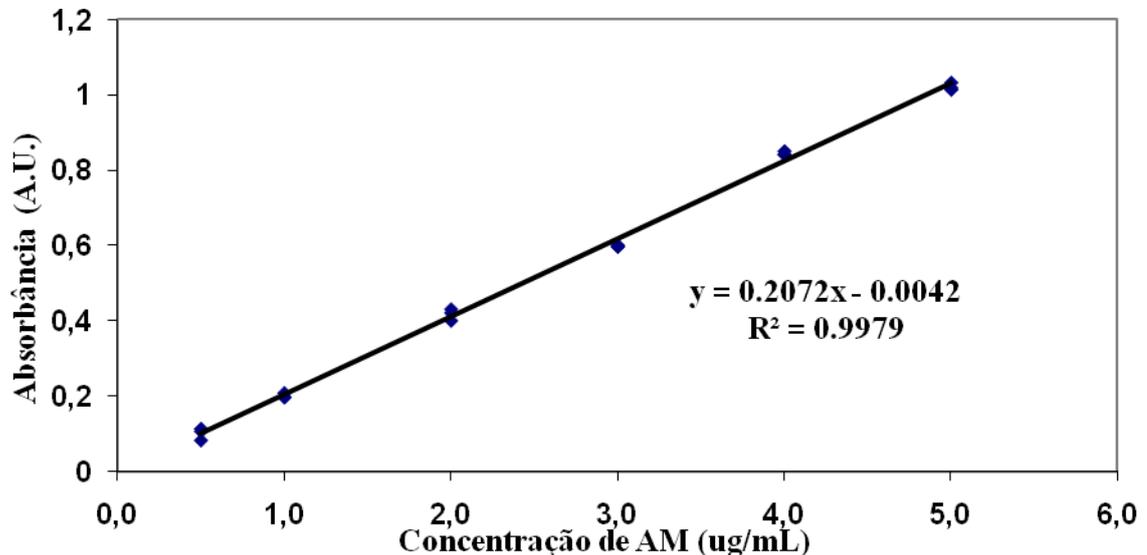


Figura 19. Curva analítica do AM em água com intervalo de concentração de 0,5 a 5,0 ug/mL obtida por espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm.

A sensibilidade do método para o AM foi expressa pela inclinação da curva analítica, e pelos valores LQ e LD de 0,86 $\mu\text{g/mL}$ e 2,87 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A precisão intra-corrída e intermediária do método foram avaliadas em três concentrações: 2, 3, 4 $\mu\text{g/mL}$ submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária e os resultados obtidos estão na Tabela 21.

Tabela 21. Precisão intra-corrída e precisão intermediária do método avaliado em concentrações diferentes de azul de metileno.

Concentração teórica (ug/mL)	Concentração experimental (ug/mL)		DPR (%)		Exatidão (%)		Valor p
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	
2	2,03 ± 0.09	1,86 ± 0.05	3,77	1,85	101,7	92,8	0,3333
3	2,91 ± 0.03	2,81 ± 0.04	0,29	0,79	97,0	93,9	0,2549
4	4,10 ± 0.04	3,76 ± 0.04	0,62	0,54	102,5	94,2	0,7951

Para repetibilidade, as leituras foram realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, método, equipamento e pelo mesmo analista. Os ensaios foram realizados em triplicata. O DPR entre as amostras de 1,68%, mostrando assim que o método é preciso.

Para a precisão intermediária, as leituras foram realizadas em dois dias diferentes utilizando o mesmo equipamento. Os ensaios foram realizados em triplicata. O DPR entre as amostras de mesma concentração e realizadas em dias diferentes foi de 1,31%, demonstrando assim que o método é preciso. Os valores de p obtido pelo teste t foram maiores que 0,05 mostrando que as médias de concentrações foram estatisticamente iguais no ensaio da corrida inter dias. O método também se mostrou exato, com uma recuperação média de 97,01%.

5.2.8 Avaliação da cinética de liberação *in vitro* do peptídeo CTT1 e do azul de metileno (AM)

Um sistema de liberação de fármacos pode ser definido como uma formulação que permite a introdução de uma substância terapêutica no organismo, melhorando sua eficácia e segurança pelo controle da velocidade, tempo e sítio de liberação do fármaco no organismo. Portanto, avaliar o perfil de liberação do fármaco da formulação pré desenvolvida é um fator crítico para selecionar uma formulação que melhore a biodisponibilidade do fármaco no organismo. Dessa forma, esse estudo pode prever o comportamento *in vivo* do sistema de liberação (STORPIRTIS *et al.*, 1998; SANTOS, 2012).

Um dos equipamentos muito utilizado na literatura científica para avaliar a liberação de fármacos é o equipamento Microette (Hanson Corporation) ilustrado na Figura 20 constituído por célula de difusão de Franz.



Figura 20. Equipamento Microette (Hanson Corporation) constituído Célula de Difusão de Franz. Onde: 1- Béquer jaquetado onde se armazena o meio receptor em temperatura constante; 2- Banho de água com temperatura constante; 3- Equipamento Microette; 4- Aparato com 6 células de Franz; 5- Amostrador. (Foto tirada pela autora).

A célula de difusão vertical de Franz, ilustrada na Figura 21, é um aparato de vidro que consiste de um compartimento receptor e de um compartimento doador mantido a 37 °C através de um termostato que entra formando uma jaqueta de água na célula. O meio receptor armazena a solução receptora que fica sob agitação magnética constante, que diluirá o fármaco liberado pela formulação e o meio doador é onde se coloca a formulação estudada.

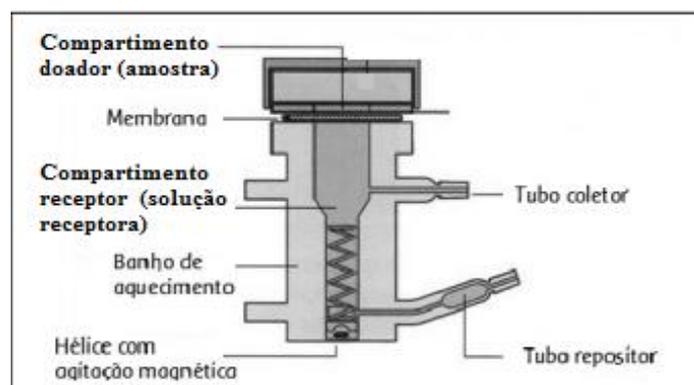


Figura 21. Esquema ilustrativo da célula de Franz (Adaptado de SERAFIM, 2013).

O esquema ilustrativo de funcionamento do equipamento está na Figura 22. Esse sistema é configurado para preencher cada célula de Franz com meio receptor oriundo do béquer jaquetado (1) aquecido pelo banho de água circulante (7) com temperatura constante de 37 °C. O protocolo pré-estabelecido é ativado no Microette (2), onde uma alíquota de meio

de receptor oriundo do béquer jaquetado é injetada por uma seringa para as células de Franz, forçando uma quantidade exatamente igual de amostra do compartimento receptor ser coletada nos vials. Antes de ocorrer isso, um ciclo de lavagem das linhas é realizado para o descarte (4). Esse procedimento de coleta é realizado para cada tempo pré-programado até o término do teste.

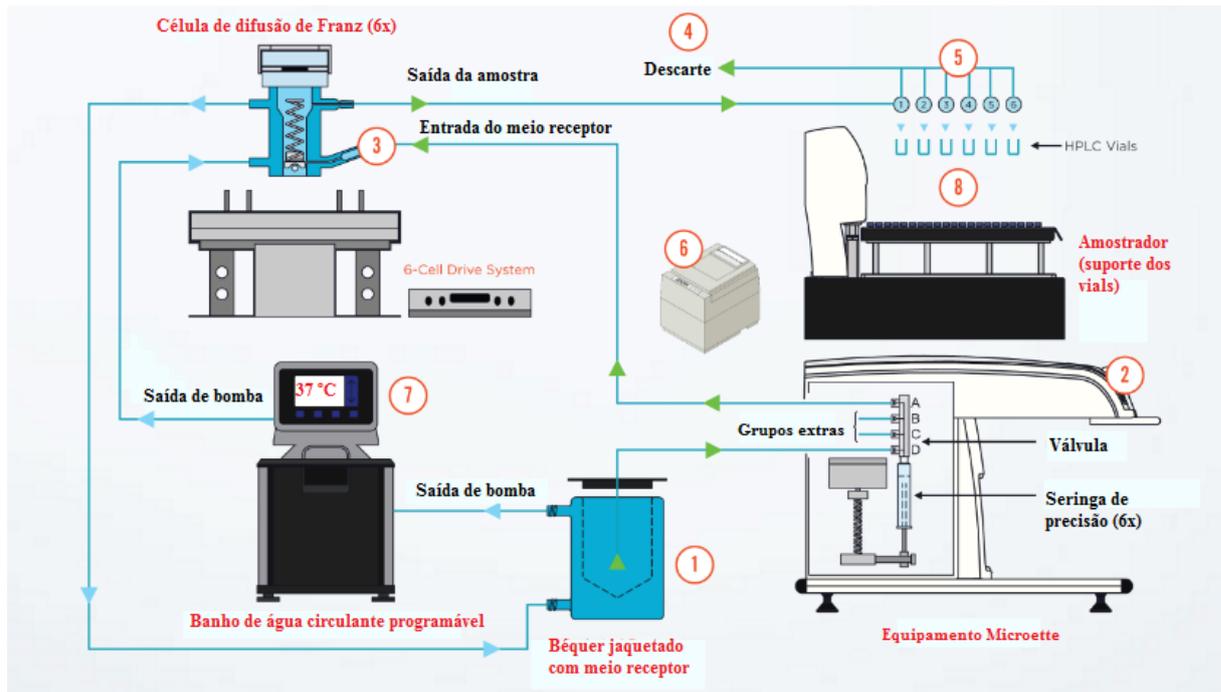


Figura 22. Esquema ilustrativo do funcionamento do equipamento Microette. (Adaptado de https://files.hansonresearch.com/wp-content/uploads/2015/03/How-the-Automated-System-Works_text.png).

O perfil de liberação do peptídeo CTT1 e do AM está ilustrado na Figura 23.

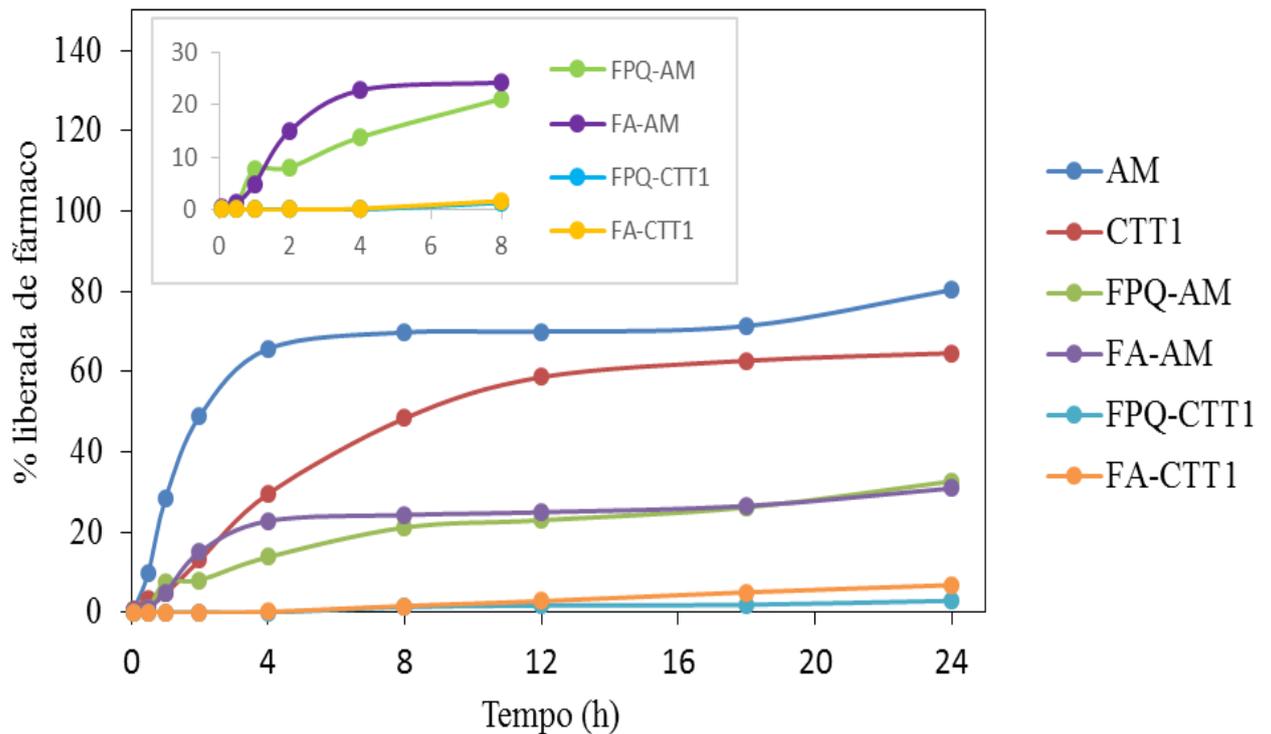


Figura 23. Perfil de liberação do peptídeo CTT1 em solução (CTT1), do peptídeo CTT1 incorporado na formulação FPQ (FPQ-CTT1), do peptídeo CTT1 incorporado na formulação FA (FA-CTT1), do AM em solução (AM), do AM incorporado na formulação na FPQ (FPQ-AM) e do AM incorporado na formulação FA (FA-AM) em 24 horas.

O AM em solução foi 50% liberado em apenas 2 horas e 80% liberado em 24 horas. Quando o AM foi incorporado nas formulações FA e FPQ, a liberação do AM foi menor, liberando 30% do AM em 24 horas. No entanto, como pode ser visto na Figura 23 que nas primeiras 8 horas uma porcentagem maior de AM foi liberada da formulação FA.

Já para o peptídeo CTT1, um comportamento semelhante foi observado. O peptídeo em solução foi 65% liberado em 24 horas, entretanto apenas 7% do peptídeo foi liberado da formulação FA e 3% do peptídeo foi liberado da formulação FPQ em 24 horas.

Esses resultados mostram que ambas as formulações se comportaram como um sistema de liberação controlada de fármacos, sendo que a formulação com a presença de polímero controlou mais a liberação do fármaco. Isso pode ser atribuído à formação de uma estrutura mais compacta e de elevada densidade de reticulação, reduzindo a capacidade de liberação do fármaco para o meio de dissolução, promovendo maior controle da liberação. Isso corrobora os dados reológicos que demonstraram que a formulação FPQ é altamente

elástica. CARDOSO (2014) também demonstrou que formulações mais elásticas controlam mais a liberação do fármaco.

Também foi claramente observado na Figura 23 que a porcentagem de peptídeo liberada foi por volta de 20 vezes menor que a porcentagem liberada de azul de metileno. A solubilização de fármacos em mesofases líquido-cristalinas pode ser na região lipofílica ou hidrofílica do cristal líquido, dependendo da sua solubilidade.

Assim, a taxa de liberação de um fármaco solubilizado numa mesofase cristalina líquida depende fortemente da localização das moléculas do fármaco na estrutura formada, isto é, se está localizado no domínio hidrofóbico, no domínio aquoso ou na camada de tensoativo. Dessa forma, por exemplo, a solubilização de fármacos lipofílicos em mesofases hexagonais ou cúbicas resulta em diminuição da liberação do fármaco. Por outro lado, para fármacos lipofílicos incorporados em mesofases lamelares ou hexagonais reversas ocorre o contrário, ou seja, a liberação é mais rápida, pois o núcleo da micela é formado pelos domínios polares da molécula de tensoativo (VROEGE *et al.*, 1992; CHEN *et al.*, 2014; CHAUDHARY *et al.*, 2016). Assim, certamente as formulações desenvolvidas apresentam um núcleo lipofílico onde se encontra o peptídeo incorporado e o AM está diluído na parte exterior hidrofílica do sistema, resultando dessa forma numa liberação mais rápida e maior do AM e mais lenta e menor do peptídeo CTT1, porém ambas as liberações de maneira controlada.

Fonseca-Santos (2015) relatou em seu estudo baixíssima liberação de curcumina em 24 horas, um fármaco altamente lipofílico, incorporado em sistemas líquidos cristalinos, indicando que o fármaco não liberou da matriz líquida cristalina. Já Junqueira *et al* (2015) relataram uma liberação de 42% de AM incorporado em hidrogéis de poloxamer 407 (P407) e Carbopol 934P (C934P) em 24 horas, corroborando assim nossos achados.

Além disso, esses resultados mostram que a incorporação de fármacos em mesofases líquidos cristalinos pode proteger os fármacos, os quais sem essa proteção teriam sua biodisponibilidade mais limitada, principalmente devido à atividade proteolítica do ambiente bucal causando sua degradação.

Os fenômenos envolvidos na liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação são muitos complexos, assim a o estudo matemático da cinética de liberação pode fornecer dados para o melhor entendimento dos perfis de liberação dos fármacos. Portanto, foi investigado qual modelo de liberação (Korsmeyer-Peppas, Higuchi, Weibull ou Primeira ordem) se adequa mais às formulações. Os dados ajustados para os modelos cinéticos selecionados estão listados na Tabela 22.

Tabela 22. Os parâmetros ajustados dos modelos cinéticos utilizados na liberação dos fármacos CTT1 e AM.

Modelos Matemáticos	Formulações			
	FA-CTT1	FPQ-CTT1	FA-AM	FPQ-AM
Korsmeyer-Peppas				
R ²	0,9964	0,9718	0,9364	0,9850
n	1,3599	1,0388	0,4116	0,5283
Higuchi				
R ²	0,8662	0,8912	0,9244	0,9842
K	0,9994	0,4660	7,4657	6,9560
1ª ordem				
R ²	0,9814	0,9716	0,7146	0,9075
K	0,0027	0,0012	0,0226	0,0213
Weibull				
R ²	0,9998	0,9907	0,9965	0,9964
b	0,6780	0,6328	0,3674	0,0213

Com base nos maiores valores de r^2 ajustado, verificou-se que para todas as formulações estudadas, o modelo que melhor se correlacionou com a liberação dos fármacos foi o de Weibull.

O modelo Weibull é considerado o modelo mais versátil, pois permite um melhor ajuste aos diferentes tipos de perfis de liberação (COSTA; LOBO, 2001). Esse modelo se baseia na Equação 7 abaixo:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b)$$

(Equação 7)

onde M_t é a quantidade cumulativa de fármaco liberado no tempo t e M_∞ é a quantidade cumulativa de fármaco liberado no tempo infinito; a é o parâmetro de escala e b é o parâmetro de forma (COSTA; SOUZA, 2001).

O valor de b está relacionado com o mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006). Desta forma, b é o parâmetro de forma

que caracteriza a curva como sendo exponencial ($b=1$; Caso 1), sigmóide ($b>1$; Caso 2) ou parabólica ($b<1$; Caso 3).

O valor de b para todas as amostras estudadas foi menor que 0,75, indicando que todas as amostras liberam o fármaco através da difusão Fickiana, a qual postula que o fluxo do fármaco vai de regiões de alta concentração para regiões de baixa concentração, com uma magnitude proporcional ao gradiente de concentração. Estes valores são consistentes com o caso 3 que exibe uma inclinação inicial mais elevada seguida por uma curvatura exponencial, como é evidente a partir dos perfis de liberação para as formulações da Figura 20.

Carvalho *et al.* (2010) observaram um comportamento semelhante quando investigaram a liberação de AZT incorporado em sistemas precursores de cristal líquido para mucosa nasal. Eles relataram que o mecanismo de liberação de todas as formulações seguiu o modelo de Weibull; no entanto, o valor de b foi dependente do grau de organização dos sistemas, ou seja, as formulações com baixo índice de consistência, que apresentaram valores semelhantes aos das formulações desenvolvidas nesse estudo, apresentaram um valor de $b < 0,75$, enquanto que as formulações mais organizadas apresentaram um valor de $b > 1,0$. Isso se deve porque na difusão Fickiana um aumento do valor de b reflete em desordem da formulação.

Esses dados estão de acordo com os nossos resultados que demonstraram que a formulação FPQ apresentou um valor de consistência maior que FA; no entanto, esses valores são baixos e, portanto, as formulações seguem o mesmo mecanismo de liberação.

5.2.9 Estudo da Fotodegradação do AM (*Photobleaching*)

A fotodegradação, ou a degradação fotoquímica, provoca uma perda de intensidade de fluorescência do fotossensibilizador devido a danos químicos induzidos por fótons ou por modificações covalentes irreversíveis após a irradiação de luz. Assim, investigar a possível degradação do AM após a irradiação da luz se torna importante a fim de garantir o sucesso da terapia fotodinâmica.

Os resultados ilustrados no gráfico da Figura 24 mostram que a degradação do azul de metileno incorporado na formulação FPQ foi menor do que AM em solução, sugerindo um efeito protetor da formulação.

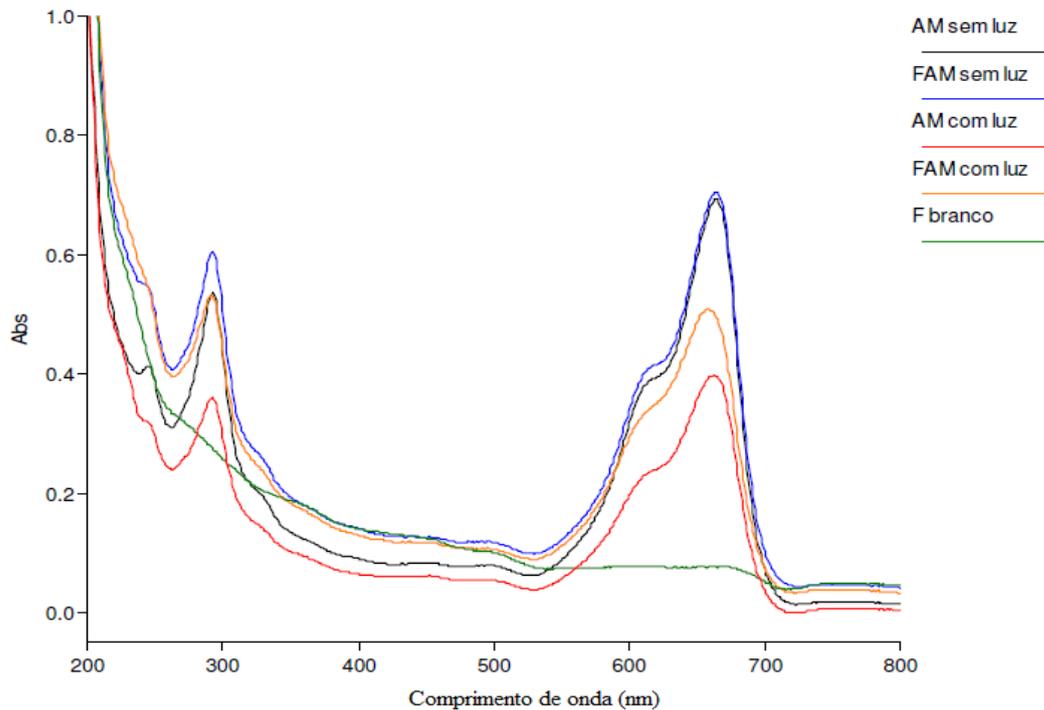


Figura 24. Espectro de absorvância da formulação FPQ, do azul de metileno em solução (AM) e do azul de metileno incorporado na formulação FPQ (FAM) antes e após 20 minutos de irradiação de luz.

Esse efeito protetor exercido por formulações também foi relatado por Tang *et al* (2008), que desenvolveram nanopartículas (NPs) de poliacrilamida para incorporação de azul de metileno. Eles relataram que o azul de metileno incorporado nas nanopartículas permaneceu intacto durante o tratamento, enquanto que o AM livre em solução foi rapidamente degradado. Além disso, o AM protegido pelas NPs induziu eficientemente danos fotodinâmicos às células tumorais.

Qin *et al.* (2011) também investigaram se as nanopartículas formadas por poliacrilamida protegeriam o AM. Os autores relataram que houve uma diminuição de 80% da intensidade fluorescente do AM em solução, enquanto que ocorreu apenas uma diminuição de 30% e 50% para o AM incorporado nas NPs, demonstrando que a formulação protege o AM.

Junqueira *et al.* (2002) investigaram o comportamento fotoquímico por medidas realizadas por espectrofotômetros UV-VIS do AM quando este interage com micelas. Eles relataram que a atração eletroquímica entre o AM e os componentes de micelas alterou o mecanismo de ação fotodinâmica do AM pela formação de dímeros de AM carregados

positivamente. Portanto, estas micelas podem alterar o mecanismo e a eficiência de sensibilização do AM carregados positivamente e, portanto, a eficiência do dano celular.

Dessa forma, estes resultados confirmam que os sistemas de liberação de fármacos, tais como os sistemas líquidos cristalinos, podem modular e proteger os fotossensibilizadores, sendo que esses efeitos são de importância crítica para desempenho clínica do AM na TFD.

5.2.10 Dicroísmo celular

Com o objetivo de investigar as mudanças estruturais que o peptídeo poderia sofrer após sua incorporação na formulação, foi proposto o teste de dicroísmo circular.

A espectroscopia eletrônica de dicroísmo circular fundamenta-se na absorção preferencial de uma das duas componentes circulares da luz linearmente polarizada pelos cromóforos da amostra analisada opticamente ativa.

Assim, caso as magnitudes dos vetores elétricos dessas componentes circulares da luz, que podem ser circularizadas em sentido horário (ER) e em sentido anti-horário (EL), forem proporcionalmente alteradas após atravessarem a amostra, essas componentes (EL e ER) serão absorvidas igualmente e a recombinação regenera a radiação linearmente polarizada original. No entanto, se as EL e ER forem absorvidas desproporcionalmente ao atravessarem a amostra, a luz passará a apresentar uma diferença de fase entre as amplitudes de suas componentes circulares, resultando numa polarização elíptica e sendo esta radiação resultante denominada de luz elípticamente polarizada, mostrando, assim, uma alteração na estrutura peptídica. Esses ângulos, por sua vez, dependem da conformação, do estado de agregação e das interações que a molécula peptídica pode fazer com o solvente ou, por exemplo, com a formulação (KELLY *et al.*, 2005; VERLY, 2010; FASMAN *et al.*, 2013; GREENFIELD *et al.*, 2015).

Portanto, as informações obtidas por dicroísmo circular facilitam a obtenção das condições ideais para a realização de experimentos, pois indicam as estruturas conformacionais do peptídeo quando incorporado na formulação.

Os espectros ilustrados na Figura 25 obtidos demonstram que não houve expressivas modificações entre os espectros do peptídeo em solução e o espectro do peptídeo incorporado na formulação. Dessa forma, os resultados sugerem que a formulação não apresenta a capacidade de alterar a estrutura do peptídeo.

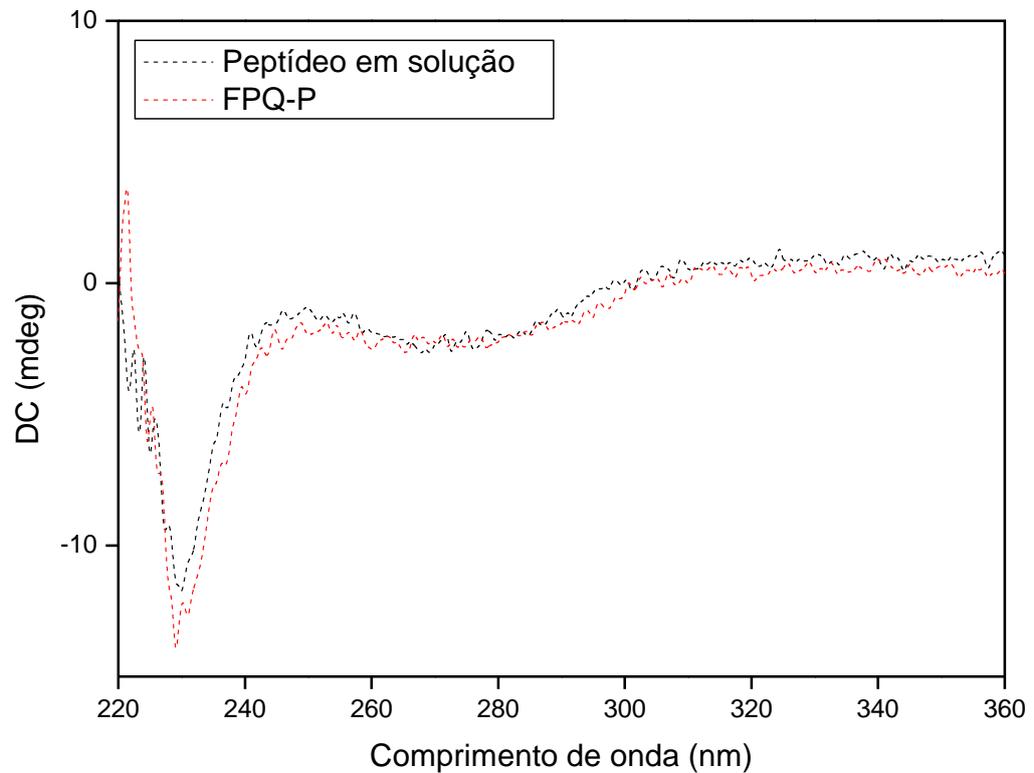


Figura 25. Espectro de CD do peptídeo em solução e após sua incorporação na formulação (FPQ- P).

5.2.11 Zimografia em gel

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases contendo zinco, que degradam proteínas por clivagem de ligações peptídicas. Foram identificadas mais de vinte MMPs, que são separadas em seis grupos com base em sua estrutura e especificidade pelo substrato, como collagenases, gelatinases, tipo de membrana [MT-MMP], estromelinas, matrilisinas, dentre outras que apresentam um papel crítico na degradação da cartilagem, remodelação do tecido, cicatrização de feridas, embriogênese e também na invasão tumoral (NAVARRO *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2006; KUPAI *et al.*, 2010; FERREIRA-SAE *et al.*, 2011).

Especificamente na invasão tumoral, estudos demonstraram que as MMPs 2 e 9 estão intensamente envolvidas nesse processo, uma vez que foi identificado que esses dois tipos de MMP são produzidas excessivamente pelas células tumorais para degradar os tecidos periféricos e, assim, invadir o estroma local, degradando a membrana basal dos vasos

sanguíneos, resultando na gênese de novos tumores, proliferação, apoptose e angiogênese (BREMER *et al.*, 2001; EGEBLAD *et al.*, 2002; NAVARRO *et al.*, 2006; KESSENBROCK *et al.*, 2015).

Por essa razão, há um grande interesse no desenvolvimento de inibidores sintéticos das MMPs, como o peptídeo CTT1, que possam ser usados no tratamento do câncer, a fim de controlar essa produção excessiva de MMPs (OCHIYA *et al.*, 2015).

Os dados obtidos nesse ensaio estão ilustrados na Figura 26.

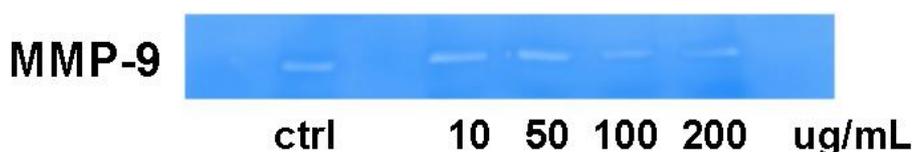


Figura 26. Zimograma em gel representativo do efeito do peptídeo CTT1 sobre a ação da enzima MMP-9 após 1 hora de incubação. As concentrações utilizadas de peptídeo foram 10, 50, 100 e 200 µg/mL. O controle (ctrl) é 5 µg do meio condicionado.

Observa-se que a o peptídeo CTT1 conseguiu inibir a atividade da enzima MMP-9 a partir da concentração de 100 µg/mL. Portanto, essa concentração de peptídeo foi adicionada na formulação FPQ, obtendo-se a formulação FPQ-P, e o teste foi realizado novamente.

Os resultados ilustrados na Figura 27 mostram que o peptídeo incorporado na formulação não conseguiu inibir a MMP-9.

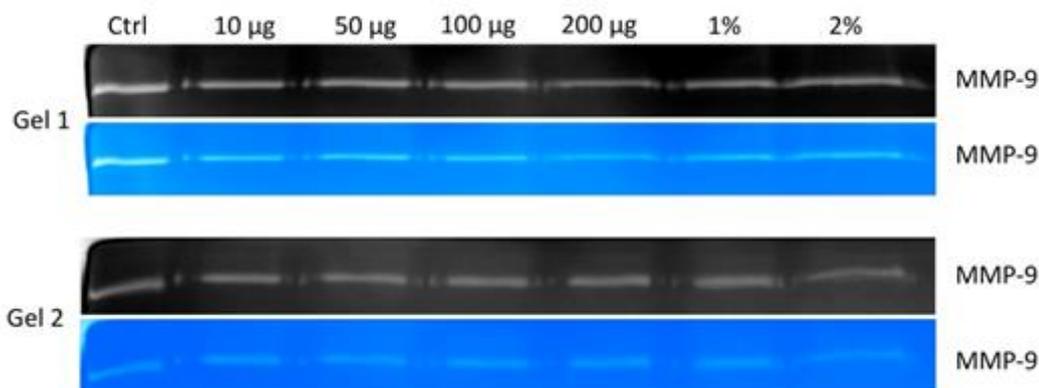


Figura 27. Zimograma em gel representativo do efeito do peptídeo CTT1 incorporado na formulação FPQ sobre a ação da enzima MMP-9 após 1 hora de incubação. As concentrações incorporadas de peptídeo foram 10, 50, 100 e 200 µg/mL. O controle (ctrl) é 5 µg do meio condicionado. 1% e 2% é a diluição de FPQ no meio condicionado.

Observa-se que não houve diferença com o controle. Portanto, resolveu-se aumentar para 12 horas o tempo de incubação da FPQ-P com as MMP-9. Além disso, utilizou-se a MMP-2 também. Infelizmente, os resultados ilustrados na Figura 28 demonstraram que o peptídeo incorporado na formulação também não conseguiu inibir a ação de ambas as enzimas.

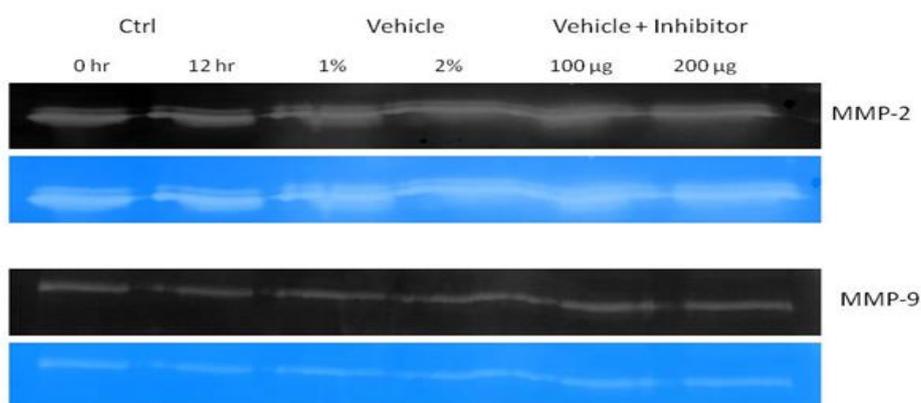


Figura 28. Zimograma em gel representativo do efeito do peptídeo CTT1 incorporado na formulação FPQ sobre a ação da enzima MMP-9 e MMP-2 após 12 horas de incubação. As concentrações incorporadas de peptídeo foram 100 e 200 µg/mL. O controle (ctrl) é 5 µg do meio condicionado. 1% e 2% é a diluição apenas de FPQ no meio condicionado.

Uma possível explicação pode ser devido aos sistemas líquidos cristalinos atuarem como sistemas de liberação controlada de fármacos, diminuindo a taxa de liberação dos fármacos. Portanto, o tempo de incubação da formulação com o meio condicionado pode não ter sido suficiente para ocorrer a liberação de peptídeo para que pudesse ser verificada a sua ação sobre a inibição das enzimas MMP (CARVALHO *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2010; GONÇALEZ *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

5.2.12 Teste de citotoxicidade *in vitro* pelo ensaio de Sulforrodamina B (SRB)

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade do peptídeo CTT1 para as linhagens SiHA e SCC 25 estão representados nas Figura 29 e Figura 30, respectivamente.

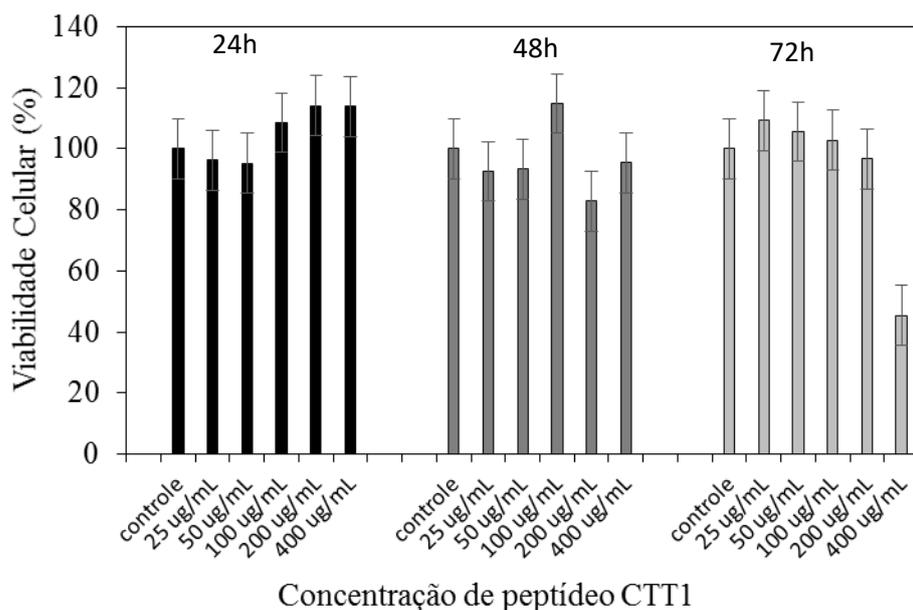


Figura 29. Efeito citotóxico de diferentes concentrações do peptídeo CTT1 em 24h, 48h e 72h sobre a linhagem celular SiHA.

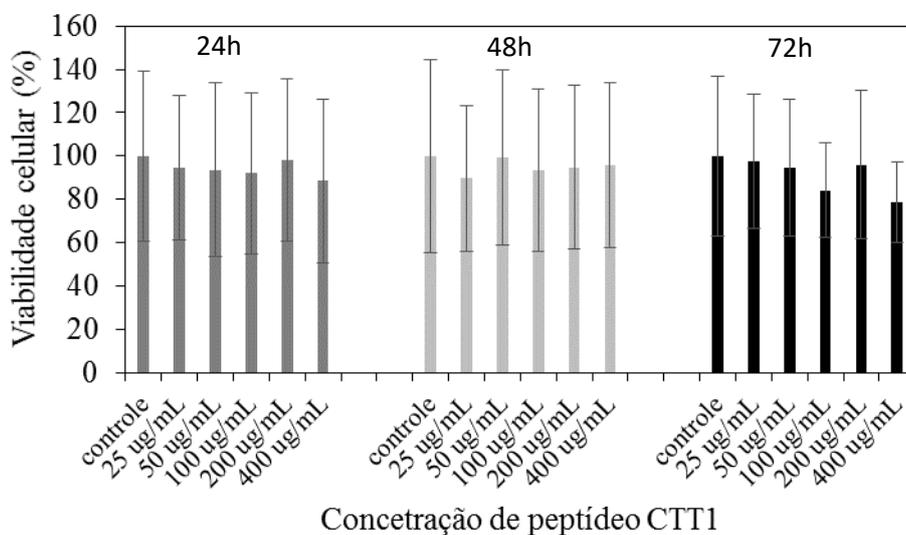


Figura 30. Efeito citotóxico de diferentes concentrações do peptídeo CTT1 em 24h, 48h e 72h sobre a linhagem celular SCC25.

Nota-se que todas as concentrações de peptídeo CTT1 não interferiram na viabilidade celular das linhagens. Possivelmente, este resultado deve-se ao mecanismo de ação do peptídeo, que não interfere na viabilidade celular, mas sim na inibição da ação das enzimas

metaloproteinases de matriz (MMPs) do tipo 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9) (KOIVUNEN *et al.*, 1999).

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade de diferentes concentrações de formulação FPQ para as linhagens SiHA e SCC 25 estão representados nas Figura 31 e Figura 32, respectivamente.

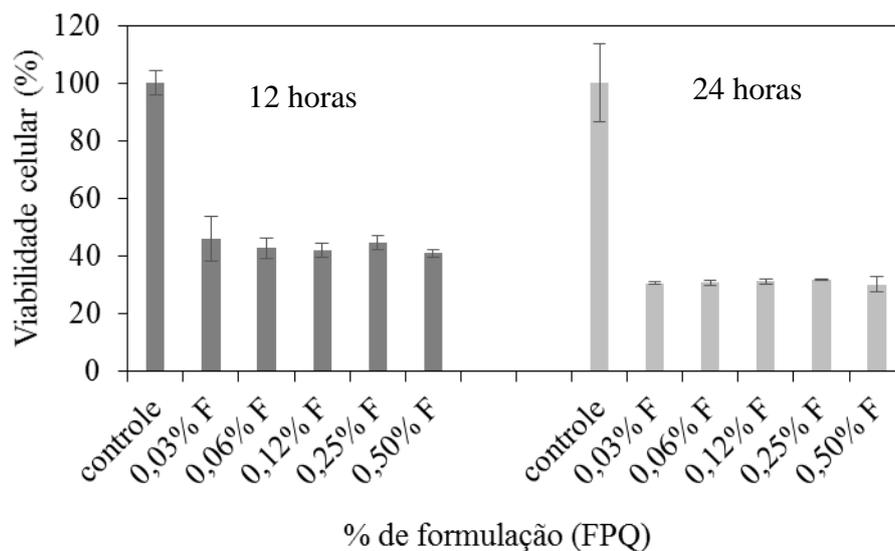


Figura 31. Determinação do potencial citotóxico de concentrações variadas (%) da formulação FPQ sobre as linhagens SiHA após 12 horas e 24 horas de tratamento.

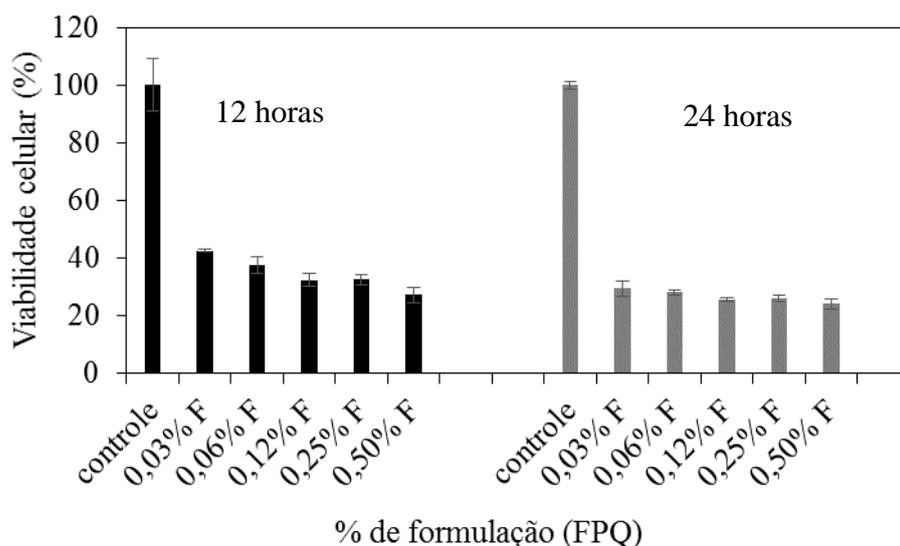


Figura 32. Determinação do potencial citotóxico de concentrações variadas (%) da formulação FPQ sobre as linhagens SCC25 após 12 horas e 24 horas de tratamento.

Os resultados demonstraram que todas as concentrações de formulação diminuíram significativamente a viabilidade celular de ambas as linhagens, indicando um efeito citotóxico significativo da formulação FPQ. Estudos demonstram que a maioria dos medicamentos para aplicação em mucosa bucal tem um potencial citotóxico. No entanto, a inferência clínica de um resultado de cultura de células é muitas vezes difícil de interpretar, uma vez que a mucosa bucal é geralmente mais resistente às substâncias tóxicas do que uma cultura de células, por causa da mucina e das camadas de queratina, o que não reflete, portanto, necessariamente o risco de efeitos adversos em longo prazo (DAHL, 1999; DAHL *et al.*, 2006).

Portanto, foi realizada a avaliação das alterações vasculares da CAM após a aplicação da formulação para estudar o potencial citotóxico da FPQ.

5.2.13 Avaliação de foto e citotoxicidade pelo método de redução do MTT

O valor de coeficiente de correlação intraclassa (CCI) calculado na calibração do teste de citotoxicidade foi de 0,959, com intervalo de confiança de 95% de 0,874 – 0,985 para a pipeta multicanal, classificado como “muito bom” de acordo com a proposta de Fermanian (1984), sendo que o limite inferior do IC95% encontra-se na classificação “boa”, ambas consideradas adequadas para estudo de calibração. Resultado semelhante foi encontrado para a calibração quando a pipeta monocanal foi utilizada. O valor de CCI calculado foi de 0,971, com intervalo de confiança de 95% de 0,892 – 0,990. O valor pontual do CCI foi classificado como “muito bom” de acordo com a proposta de Fermanian (1984), e o limite inferior do IC95% como “boa”, ambas consideradas adequadas para estudo de calibração.

A Figura 33 mostra o comportamento das linhagens quando tratadas com concentrações variadas de formulação, peptídeo e azul de metileno.

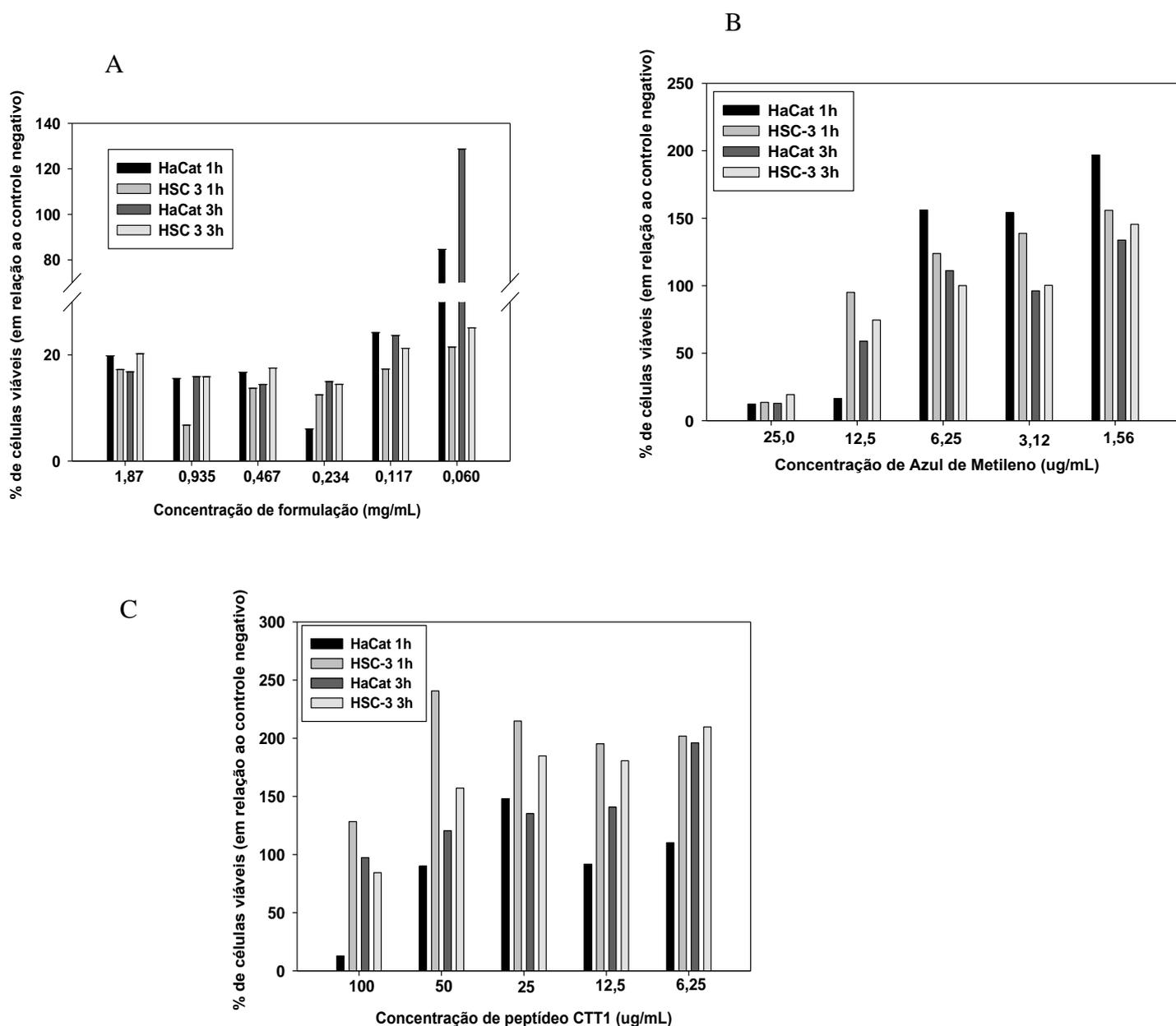


Figura 33. Determinação do potencial citotóxico de concentrações variadas da (A) formulação (mg/mL), (B) azul de metileno (ug/mL) e (C) peptídeo CTT1 (ug/mL) sobre as linhagens HaCaT e HSC-3 após 1 hora de tratamento e 3 horas de tratamento.

Nota-se que concentrações altas da formulação selecionada FPQ foram tóxicas, sendo que apenas a concentração de 0,06 mg/mL não foi tóxica para a linhagem HaCat, enquanto que foi tóxica para a linhagem HSC-3. He *et al.* (2009) relataram em seu estudo que concentrações altas de nanopartículas desenvolvidas para incorporação de azul de metileno também apresentaram citotoxicidade sem a presença do AM em linhagens celulares HELA. Dessa forma, eles utilizaram uma concentração baixa de nanopartícula para impedir que a formulação branco provocasse citotoxicidade, provavelmente porque com concentração altas de formulação, as células são completamente revestidas pela formulação, o que compromete a

troca de nutrientes celulares com o meio de cultura (VILAÇA *et al.*, 2013; MARTINHO *et al.*, 2015)

Apenas a concentração de 25 µg/mL de azul de metileno diminuiu a viabilidade celular de ambas as linhagens na ausência de luz. De Freitas *et al.* (2015) relataram que a concentração de 12,5 mg/mL de AM foi tóxica na ausência de luz para células de carcinoma cervical após 20 minutos de incubação. Portanto, os resultados obtidos são satisfatórios.

Praticamente, todas as concentrações de peptídeo CTT1 não interferiram na viabilidade celular das linhagens, que pode ser devido ao seu mecanismo de ação que não interfere na viabilidade celular, mas sim na inibição da ação das enzimas metaloproteinases matriz (MMPs) do tipo 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9) (KOIVUNEN *et al.*, 1999).

Segunda a literatura, as células cancerígenas aumentam a produção e excreção das MMP-2 e MMP-9, ocasionando o aumento da progressão do tumor, uma vez que essas enzimas têm a capacidade de hidrolisar o colágeno IV (HEIKKILEA *et al.*, 2006). Portanto, o teste de zimografia foi incluído no projeto para verificar a inibição da hidrólise do colágeno tipo IV pelo peptídeo.

Os testes de fotocitotoxicidade foram realizados com azul de metileno em solução (AM) e incorporado na formulação FPQ diluída (0,06 mg/mL), nomeada de FAM, com o tempo de incubação de 1 hora, que foi o tempo que o peptídeo CTT1 (P) ficou incubado com o meio condicionado, inibindo a ação da enzima metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9).

Esse teste foi realizado com diferentes concentrações de azul de metileno (12,5; 6,25; 3,12; 1,56 µg/mL) em solução e incorporado na FD utilizando duas doses de luz (12,5 J/cm² e 25 J/cm²). Os resultados estão ilustrados na Figura 34.

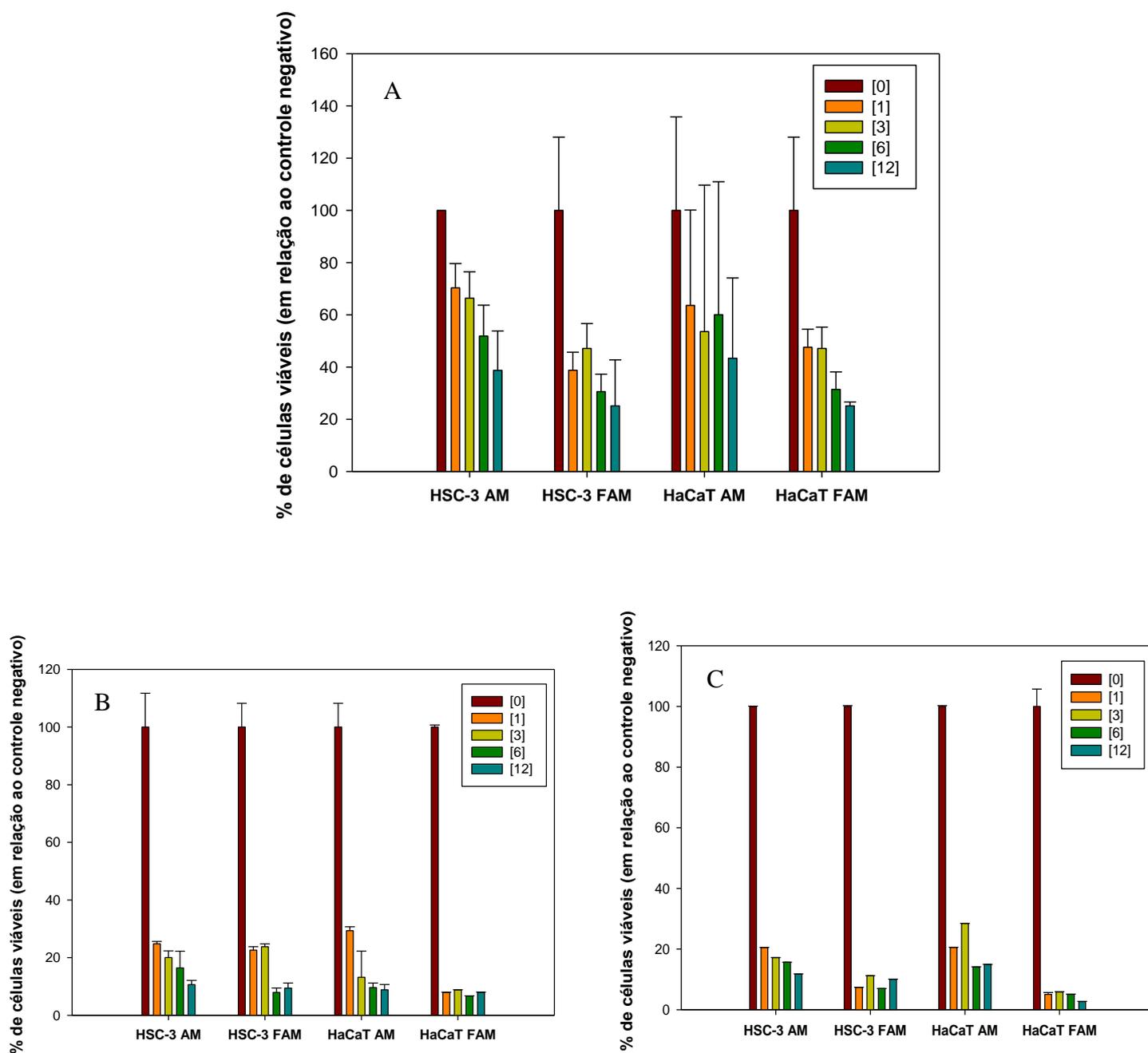


Figura 34. Efeito citotóxico do azul de metileno na ausência de luz (A) e mediada pela terapia fotodinâmica com LED 660 nm com dose de luz de 12,5J/cm² (B) e 25 J/cm² (C) sobre as linhagens HaCaT e HSC-3. As concentrações utilizadas de azul de metileno foram 0, 1, 3, 6 e 12 µg/mL.

O AM em solução ou incorporado na formulação teve um efeito citotóxico significativamente maior na presença de luz do que na ausência de luz para ambas as linhagens, demonstrando que a TFD foi capaz de atingir seu objetivo que é causar

citotoxicidade para a destruição de tumores após a estimulação do fotossensibilizador pela luz (VANACLOCHA *et al.*, 2015).

Além disso, a viabilidade celular da HSC3 tende a diminuir depois do tratamento com o AM incorporado na formulação (FAM).

Os resultados demonstraram também que não houve diferença na citotoxicidade provocada pelas diferentes concentrações de AM quando este está incorporado na formulação, o que não ocorreu quando o AM está em solução, pois este foi dose-dependente.

He *et al.* (2009) relataram que o AM incorporado em nanopartículas foi mais eficiente do que em solução, induzindo danos fotodinâmicos em linhagens celulares de câncer cervical Hela.

Estes resultados indicam que o tratamento com o AM incorporado na formulação teve um efeito citotóxico significativo mesmo em baixa concentração, o que demonstra que a formulação consegue favorecer a absorção do AM pelas células, o que, conseqüentemente, resultará na necessidade de uma dose menor de fármaco e, assim, ajudará a diminuir os possíveis efeitos colaterais da TFD em tecidos saudáveis (ALLEN *et al.*, 2015).

5.2.14 Ensaios *in vivo* utilizando o modelo de membrana corioalantóica de embrião da galinha (CAM)

5.2.14.1 Ensaio para avaliação das alterações vasculares da CAM

Os resultados das alterações vasculares provocadas pela aplicação de 40 μ L dos componentes isolados da formulação sobre a CAM estão na Figura 35.

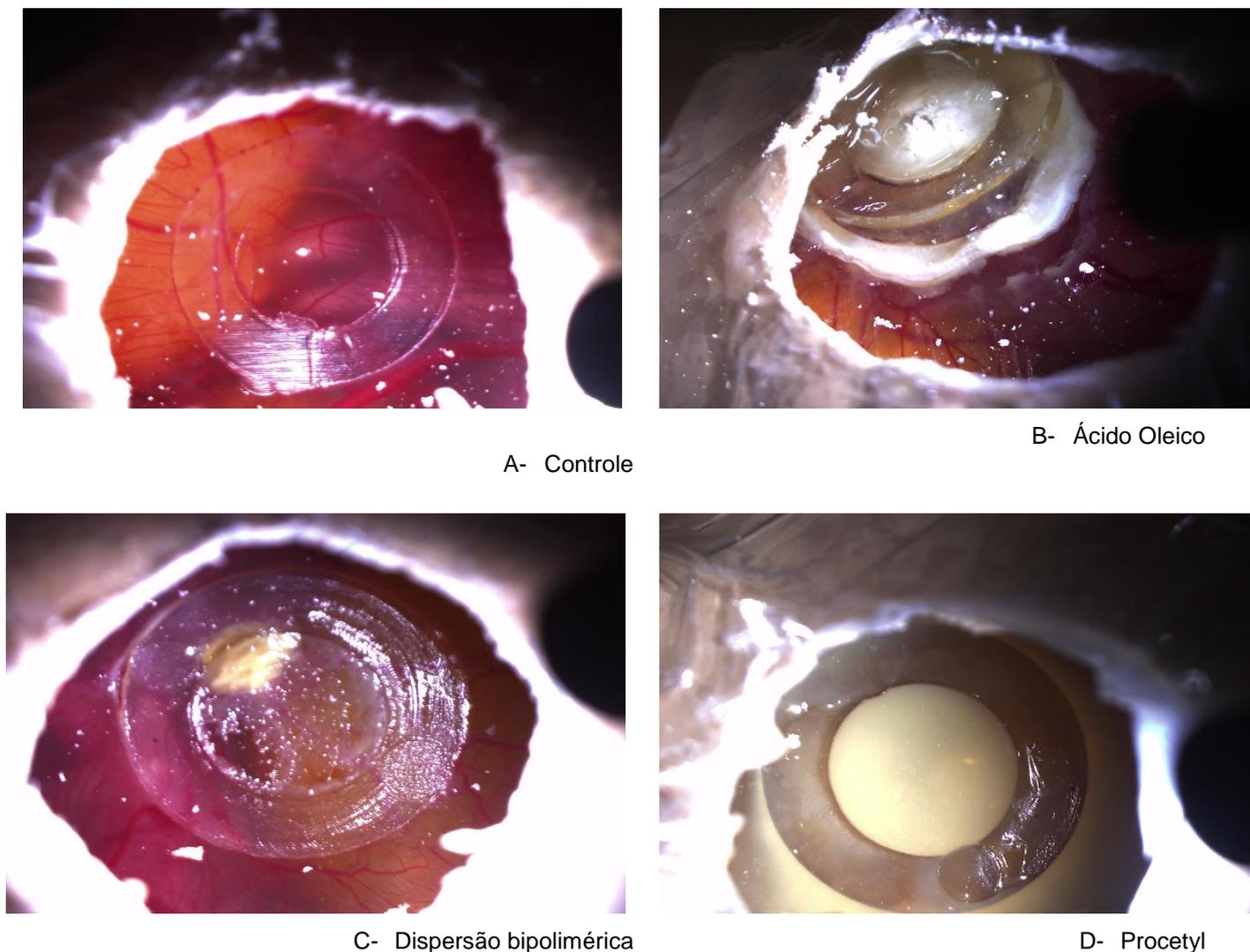


Figura 35. Imagens representativas (10x magnitude) do CAM para avaliação das alterações vasculares in ovo no 17º dia de desenvolvimento embrionário do controle (A) e após a aplicação de 40 uL de fase oleosa ácido oleico (B), dispersão bipolimérica contendo 0,25% de quitosana e 0,25% de polietilenoimina (C) e tensoativo Procetyl[®] AWS (D).

Observa-se que o tensoativo Procetyl[®] AWS provocou uma grande alteração vascular na CAM, indicando ser tóxico, uma vez que as reações adversas mais comuns em formulações tópicas, principalmente aquelas compostas por tensoativos, é a irritação da pele ou da mucosa, que pode provocar uma lesão desencadeada por processos histoquímicos e biológicos que resultam em uma ação vasomotora a fim de restaurar o equilíbrio fisiológico da pele ou mucosa (SILVA *et al*, 2014).

No entanto, o nosso grupo de pesquisa demonstrou por 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)

Um estudo realizado em CAM para investigar o efeito vascular de microemulsões constituídas por 90% de tensoativo não iônico (Procetyl[®] AWS) e ácido oleico demonstrou que 200 μ L da formulação sem fármaco também foi altamente tóxica (ALANY *et al.*, 2006). Por outro lado, um outro estudo elaborado para verificar o efeito antiangiogênico do fármaco barberina incorporado em nanoemulsões formadas com 30% de tensoativo não iônico utilizando o modelo de CAM revelou que 2 μ L das nanoemulsões sem a incorporação do fármaco não provocou toxicidade (PUND *et al.*, 2014).

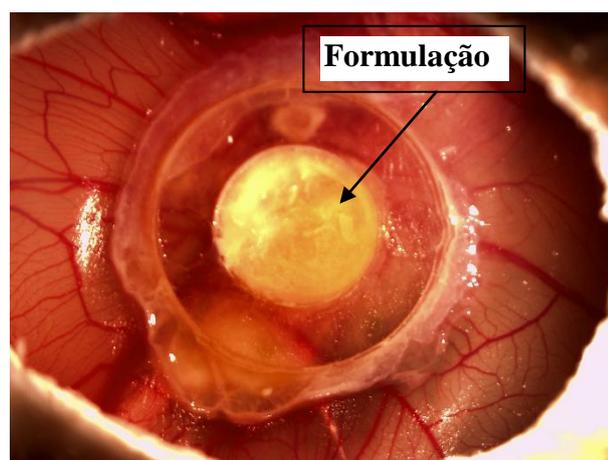
Portanto, a toxicidade provocada na CAM pode ser devido à quantidade alta de formulação aplicada na superfície da CAM e alta porcentagem de tensoativo utilizada na formulação.

Portanto, foram testadas várias diluições da formulação FPQ para estabelecer a concentração de formulação que não provoca toxicidade para a CAM. Além disso, o protocolo do tratamento foi alterado para a aplicação de 10 μ L de formulação por dia durante quatro dias.

Os resultados demonstraram que 10% da formulação FPQ diluída em PBS 1x não apresentou alterações nos vasos sanguíneos da CAM como ilustrado na Figura 36, portanto essa foi a porcentagem de formulação (FPQ10) selecionada para a realização do teste de avaliação do crescimento tumoral *in ovo*.



A- Controle



B- FPQ 10

Figura 36. Imagens representativas (10x magnitude) do CAM para avaliação das alterações vasculares *in ovo* no 17^o dia de desenvolvimento embrionário do controle (A) e após a aplicação de 10 μ L por dia durante 4 dias de 10% de FPQ em PBS 1x (FPQ 10) (B).

5.2.14.2 Ensaio para avaliação do crescimento tumoral

Inicialmente, esse teste foi realizado com o crescimento das células SiHA por 4 dias na CAM e então os tratamentos foram realizados com a aplicação de 10 μ L por dia durante 4 dias de FPQ10, peptídeo CTT1, CTT1 incorporado na FPQ10 e controle (sem tratamento) como ilustrados na Figura 37.

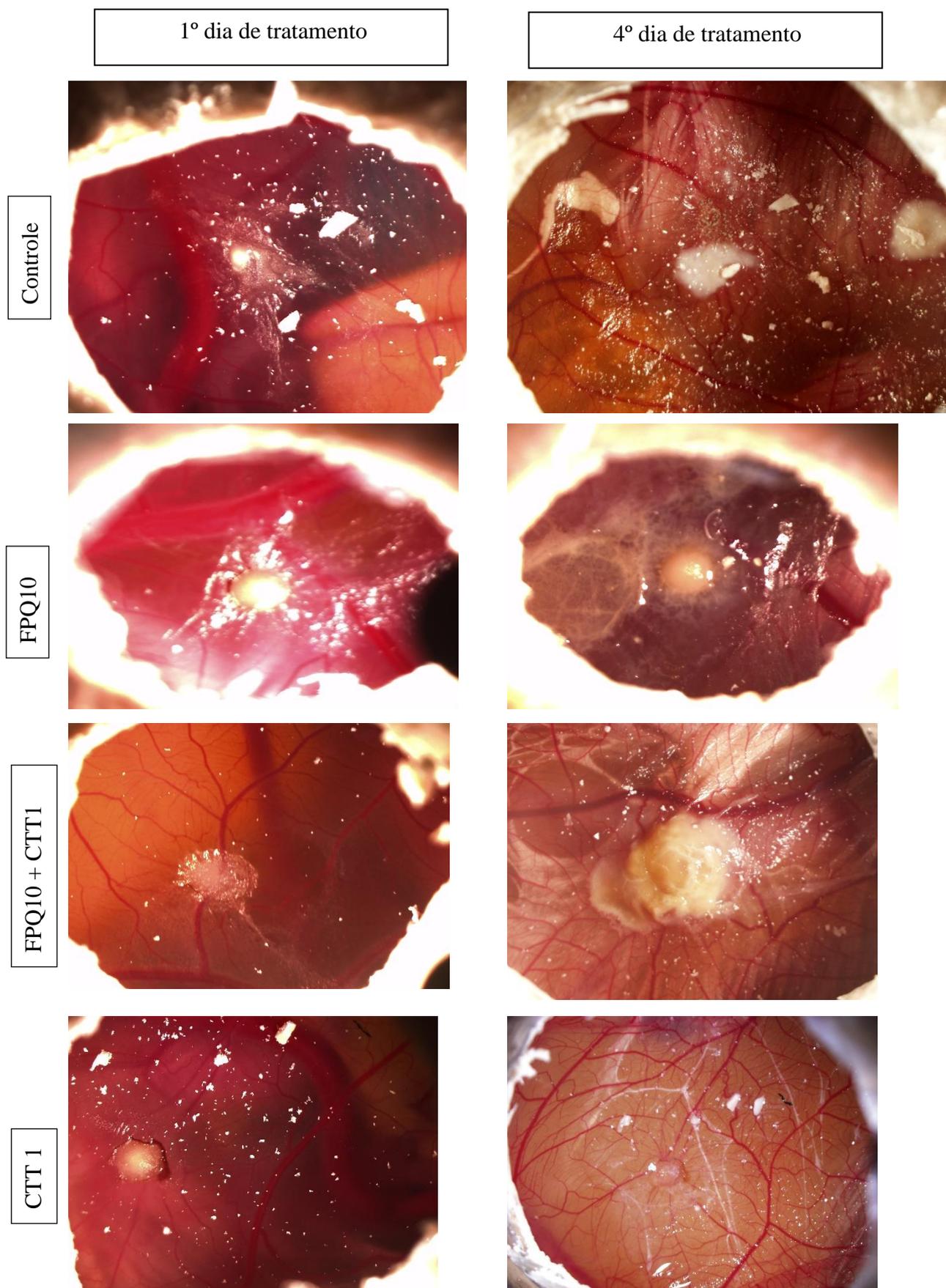


Figura 37. Imagens representativas (10x magnitude) do efeito dos tratamentos no crescimento das células SiHA.

Como pode ser observado, o tumor sem tratamento e tratado com a formulação FPQ10 continuou a crescer enquanto que o tumor tratado apenas com o peptídeo CTT1 reduziu claramente o crescimento tumoral. Apesar da potencialidade do peptídeo em diminuir a massa tumoral, tal resultado não se reproduziu quando o peptídeo foi incorporado na formulação (FPQ + CTT1). Isso pode ser devido ao perfil de liberação da formulação que retarda a liberação do peptídeo em 8 horas.

No final do experimento, a CAM foi retirada e colocada em formol em placas de 6 poços para a contagem de vasos sanguíneos ao redor do tumor. Os resultados estão demonstrados na Figura 38.

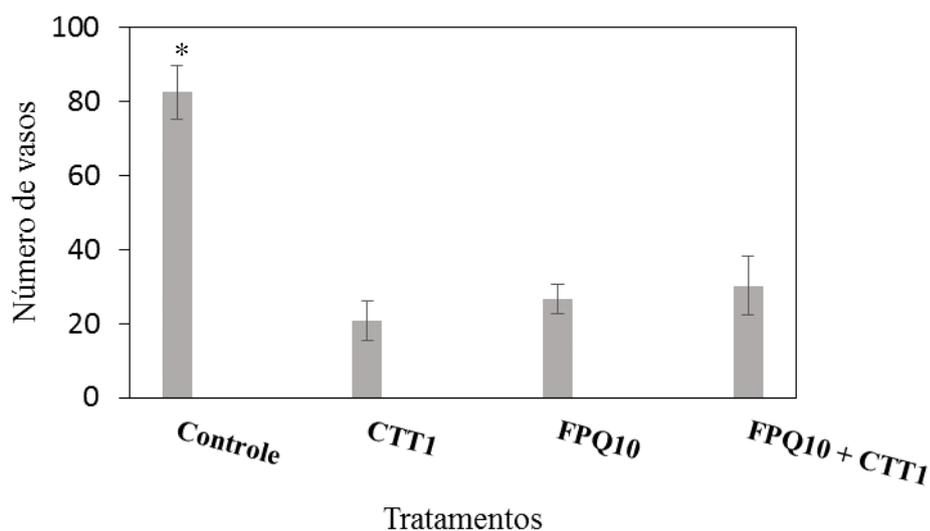


Figura 38. Números de vasos contados *ex ovo* ao redor do tumor. * $p < 0,05$.

A diminuição dos vasos sanguíneos pelo peptídeo CTT1 pode ser devido à inibição das metaloproteinases de matriz. A literatura demonstra que a formação de novos capilares pelas células endoteliais requer a migração de células endoteliais e extensa remodelação do tecido, um processo que necessita de metaloproteinases de matriz e outras proteinases. Portanto, as propriedades antiangiogênicas dos inibidores da metaloproteinases de matriz, como o peptídeo CTT1, podem contribuir para a diminuição de vasos e do tumor, pois o crescimento de um tumor sólido depende largamente dos nutrientes proporcionados pela vasculatura recrutada pelo tumor através da angiogênese (VILAÇA *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por NYBERG *et al.* (2002) utilizando o modelo *in vivo* de CAM mostrou que a ativação do metaloproteinases MMP-9 por tripsina 2 (TAT2) aumentou a invasão de células de carcinoma humano de língua (HSC-3). Para eles confirmarem esse estudo eles utilizaram o peptídeo CTT1 como um inibidor específico de MMP-9 demonstrando, assim, que a eficiência de intravasão de HSC-3 diminuiu. Intravasão é passo chave do processo de carcinoma que leva a metástase.

Foi observado também que o tratamento tanto com a formulação FPQ10 quanto com o peptídeo incorporado na formulação FPQ10 também diminui os números de vasos em relação ao controle, apesar de demonstraram um pequeno aumento em relação ao peptídeo CTT1.

Posteriormente, foi realizada a avaliação do crescimento tumoral após o tratamento aplicando 10 μ L de AM, AM incorporado a formulação FPQ10, FPQ10 e controle (sem tratamento) com ou sem a terapia fotodinâmica com dose de luz de 100 J/cm² utilizando um LED desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT, USP, São Carlos, Brasil) com o comprimento de onda de 660 nm. Nesse experimento houve uma grande perda dos ovos devido à contaminação por fungos.

As Figura 39 e Figura 39 mostram as imagens da CAM após 4 dias de tratamento sem (-) e com (+) a terapia fotodinâmica, respectivamente.

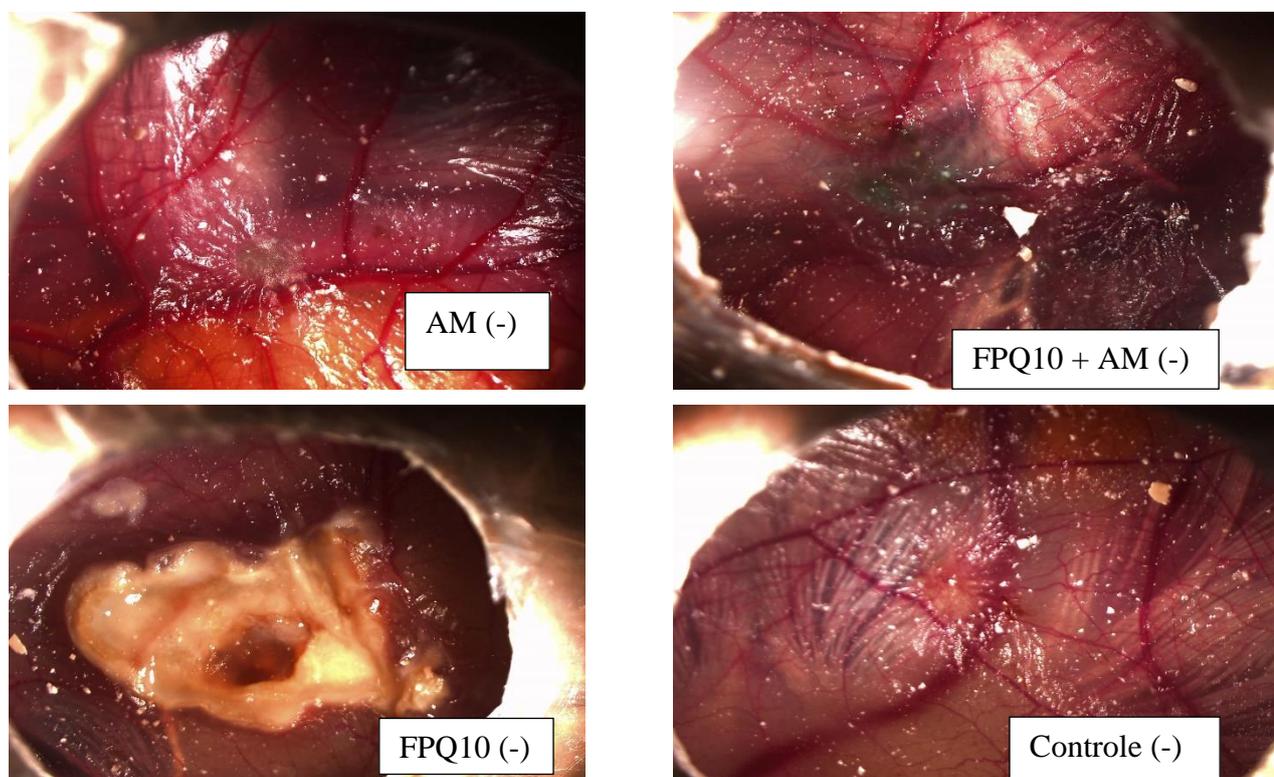


Figura 39. Imagens do efeito dos tratamentos no crescimento das células SiHA após 4 dias de tratamento sem a terapia fotodinâmica.

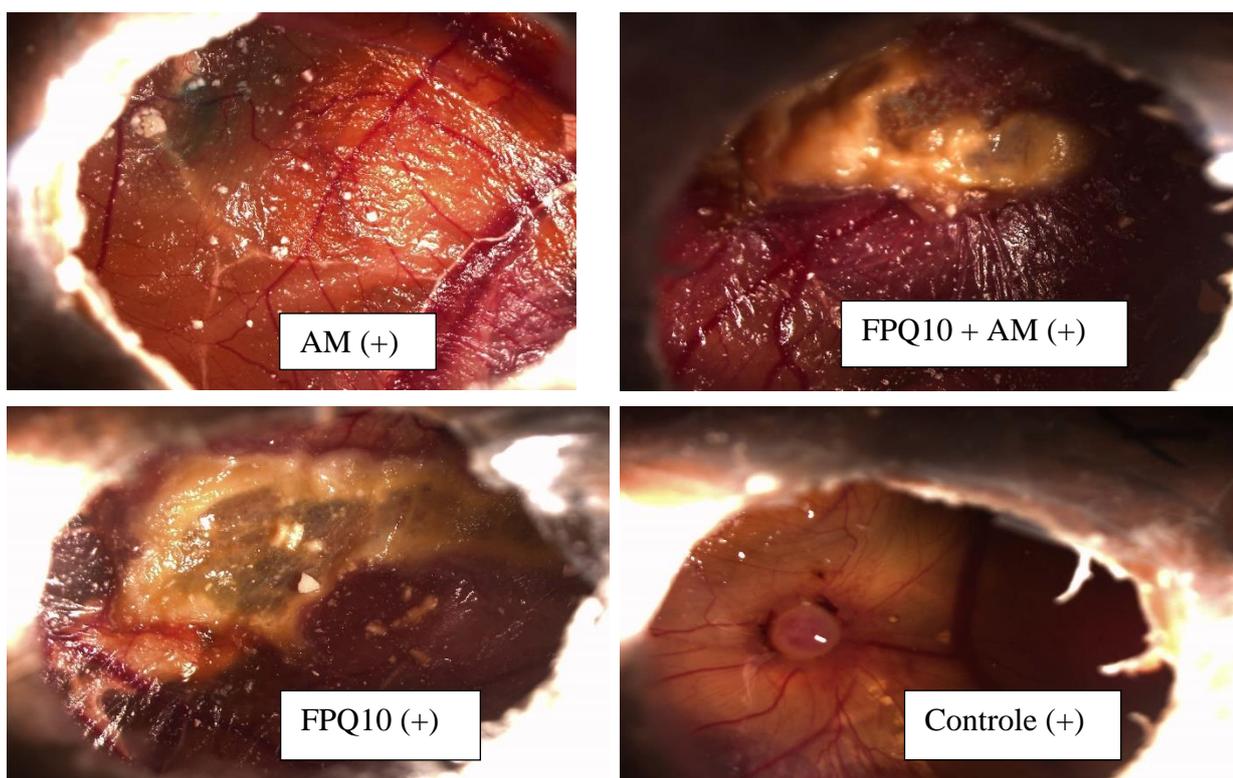


Figura 40. Imagens do efeito dos tratamentos no crescimento das células SiHA após 4 dias de tratamento com a terapia fotodinâmica.

Observa-se que não houve diferença com ou sem a terapia fotodinâmica. Isso pode ser devido à baixa concentração de AM e/ou a baixa dose de luz utilizada. Estudos na literatura *in vivo* para investigar a ação da terapia fotodinâmica do azul de metileno (1 mg/mL) foram realizados apenas em ratos utilizando doses de luz de 200 J/cm² (ORTH *et al.*, 2000; HE *et al.*, 2009).

Junqueira *et al.* (2015) estudaram a ação *in vivo* da TFD do AM incorporado em sistemas poliméricos constituídos por poloxamer e carbopol 974 em *Artemia salina*. Eles relataram que tanto a formulação sem AM quanto o AM em solução mostraram toxicidade na ausência e na presença de luz. Quando incorporado na formulação, o AM mostrou ainda uma redução da taxa de mortalidade da *Artemia salina*, que pode ser explicado pelo fato de AM nos sistemas não estar completamente livre, sendo gradualmente liberado.

É importante enfatizar que o AM não apresenta qualquer dano ao corpo humano, sendo amplamente utilizado na área médica, como por exemplo, para o tratamento da intoxicação por monóxido de carbono, marcador cirúrgico, infecções do trato urinário, entre outros (BARBER *et al.*, 1995; CRAGAN, 1999; CLIFTON *et al.*, 2003).

6 CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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