

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

“Desenvolvimento de formulação termorreversível e mucoadesiva contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de curcumina para aplicação bucal”

ANA GABRIELA ORTEGA DUBON

PORTO ALEGRE, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

“Desenvolvimento de formulação termorreversível e mucoadesiva contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de curcumina para aplicação bucal”

Dissertação apresentada por **Ana Gabriela Ortega Dubón** para obtenção de GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Dra. Karina Paese

Porto Alegre, 2020

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em dia 04.05.2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a Roselena Silvestri Schuh

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Tanira Aguirre

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof^a Valquíria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ortega, Ana

Desenvolvimento de formulação termorreversível e mucoadesiva contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de curcumina para aplicação bucal / Ana Ortega. -- 2020.

108 f.

Orientadora: Karina Paese.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. nanocápsulas de núcleo lipídico. 2. hidrogéis termorreversíveis. 3. mucoadesão. 4. câncer epidermóide bucal. 5. curcumina. I. Paese, Karina, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405, na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Sinalização Celular do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES e FAPERGS. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Sara e Hector, por seu apoio e incentivo de me superar pessoal e profissionalmente.

À Grupo de Bolsas OEA-PAEC-COIMBRA pela oportunidade de concorrer na seleção internacional de Universidades Federais Brasileiras.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de fazer meus estudos de Pós-Graduação.

À Professora Karina Paese, além da sua orientação, pela paciência, compreensão e carinho.

À minhas irmãs Lourdes, Claudia e Sara, por seu apoio e palavras de animo apesar da distância.

À Julie Izolan pelo auxílio e escuta, e me ajudar a atravessar momentos desafiantes ao longo do processo.

As colaboradoras do meu trabalho que com muita disposição e motivação me ajudaram a me desenvolver como mestranda: Ayana Brêtas, Leidyana da Costa e Kelly Zatta.

A Keyla Patzán e Violeta Santiago, colegas do mesmo programa internacional. Percorremos o caminho de realizar nossos estudos de pós-graduação longe de casa, compartilhando nossas experiências tanto em momentos bons como momentos mais desafiadores.

Aos colegas do Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia por sua ajuda e por compartilharem o espaço físico com disposição para a realização dos nossos trabalhos.

À CAPES pelo apoio financeiro da bolsa da pesquisa, pelo apoio financeiro sob meus estudos.

RESUMO

O objetivo do estudo foi desenvolver e caracterizar físico-quimicamente hidrogéis termosensíveis contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de curcumina (composto por os lipídios monoestearato de sorbitano e óleo de semente de uva), sendo depois revestidas com quitosana visando à administração bucal para o tratamento de diversas doenças. As nanocápsulas foram obtidas empregando-se a técnica de deposição interfacial de polímero pré-formado. As características físico-químicas de distribuição de diâmetro de partícula, diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH foram avaliadas. Realizou-se um estudo liberação *in vitro* em meio salivar simulado. Os hidrogéis foram produzidos com hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e Poloxamer[®] 407, empregando-se dispersão manual. Avaliou-se a mucoadesão por meio de estudo de lavabilidade utilizando-se mucosa de bochecha suína. Adicionalmente, a análise de textura foi empregada para avaliar o trabalho de mucoadesão. O Potencial Irritante (IR) das formulações foi determinado com o teste da membrana corolantóide de ovos de galinha embrionados (HET-CAM) e a citotoxicidade *in vitro* foi determinada através da atividade mitocondrial por MTT, empregando a linhagem celular SCC-25. A concentração final de curcumina nas nanocápsulas é de 0,9 mg.mL⁻¹. As nanocápsulas revestidas com quitosana apresentaram D(4,3) igual a 179 ± 48 nm, o potencial zeta de +19.00 ± 3,18 mV. O teor de curcumina e a taxa de associação foram próximos a 100%. Os perfis de liberação da curcumina das formulações revestidas e não revestidas se sobrepõem, indicando que não houve influência do revestimento na liberação. Os hidrogéis apresentaram maior trabalho de mucoadesão do que as formulações de nanocápsulas, adicionalmente a curcumina permaneceu por maior tempo interagindo com a mucosa bucal quando as suspensões foram incorporadas nos hidrogéis, confirmando maior resistência ao fluxo salivar. Todas as formulações foram classificadas como não irritantes quando avaliadas por HET-CAM. Os resultados apontam se tratar de uma formulação nanotecnológica mucoadesiva promissora para aplicação bucal por atribuir propriedades físico-químicas adequadas e tolerabilidade, com a possibilidade de carrear diversos compostos de interesse.

Palavras-chave: câncer epidermóide bucal, curcumina, hidrogéis termorreversíveis, hidroxipropilmetilcelulose, nanocápsulas de núcleo lipídico, mucoadesão.

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop and characterize physicochemically thermosensitive hydrogels containing lipid core (composed of sorbitan monostearate and grape seed oil) curcumin-loaded nanocapsules coated with chitosan for buccal applications, as a platform to treat several diseases. The nanocapsules were prepared by the interfacial deposition of preformed polymer technique. Physicochemical characteristics of particle size distribution, mean diameter, polydispersity index, zeta potential, and pH were analyzed. An *in vitro* release profile was performed in simulated salivary medium. The hydrogels were produced with hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and Poloxamer® 407, using manual agitation. Mucoadhesion was evaluated by a washability test using porcine buccal mucosa. Additionally, tensile analysis was performed to evaluate the work of mucoadhesion. The irritant potential (IR) of the formulations was evaluated by hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM) and cytotoxicity *in vitro* of the different formulations was determined by mitochondrial activity with MTT, using an SCC-25 cell line. The curcumin concentration was 0.9 mg.mL⁻¹, For chitosan coated nanocapsules the D(4,3) was 179 ± 48 nm, a zeta potential of +19.00 ± 3.18 mV. The drug content and encapsulation efficiency were close to 100%. The curcumin release profile overlaps for nanocapsules coated and uncoated, suggesting that the chitosan-coating did not influence the active substance release. Hydrogels showed higher mucoadhesion work than nanocapsules, in addition, curcumin nanoencapsulated remained in the mucous membrane for longer time when they were incorporated in the hydrogels, indicating that were more resistant to salivary flux than the nanocapsules in suspension. All the formulations were classified as non-irritant when were avaliated by HET-CAM. Results point that this is a nanotechnologic mucoadhesive formulation promissory for application on buccal mucosa for attributing adequated physicochemical properties and tolerability, moreover the possibility of carrying several compounds of interest.

Keywords: curcumin, hydroxypropylmethylcellulose, lipid-core nanocapsules, thermosensitive hydrogels, mucoadhesion, Oral squamous cell carcinoma (OSCC).

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Estrutura química do Poloxamer® 407. Copolímero formado por três blocos. x: Bloco de PEO (Óxido de Polietileno); y: Bloco de PPO (Óxido de Polipropileno); z: Bloque de PEO (Óxido de Polietileno)34
- Figura 2.** Representação da Estrutura Química da Quitosana.....38
- Figura 3.** Estrutura Química da Curcumina.....42

CAPÍTULO II: ARTIGO CIENTÍFICO

- Figure 1.** (a) Particle size distribution obtained by laser diffraction of the LNCc (curcumin-loaded lipid-core nanocapsules) and CLNCc (chitosan-coated curcumin-loaded lipid-core nanocapsules); (b) LNCc morphology analyzed by transmission electronic microscopy; (c) CLNCc morphology analyzed by transmission electronic microscopy (bar = 100 nm)..... 59
- Figure 2.** Drug release profile of LNCc (curcumin-loaded lipid-core nanocapsules) and CLNCc (chitosan-coated curcumin-loaded lipid-core nanocapsules). Values represent mean \pm standard deviation (n = 4).....62
- Figure 3.** (a) Particle size distribution obtained by laser diffraction of the H-LNCc (hydrogel containing curcumin-loaded lipid-core nanocapsules) and H-CLNCc (hydrogel containing chitosan-coated curcumin-loaded lipid-core nanocapsules); (b) H-LNCc morphology analyzed by transmission electronic microscopy; (c) H-CLNCc morphology analyzed by transmission electronic microscopy (bar = 100 nm)..... 64
- Figure 4.** Sol-gel transition temperature ($T_{sol-gel}$) obtained by means the point where the curve inflection occurs when plotting temperature in function of loss modulus G'' . H-LNCc (Hydrogel containing curcumin-loaded lipid-core nanocapsules), H-CLNCc (Hydrogel containing chitosan-coated curcumin-loaded lipid-core nanocapsules) and H-H₂O (Hydrogel containing water).....65
- Figure 5.** Curcumin washability on simulated salivary medium of the formulations LNCc, CLNCc, H-LNCc and H-CLNCc. Values represent mean \pm standard deviation (n = 4). *Different from the nanocapsules suspensions formulations and their respective form as hydrogels; **H-CLNCc different from the H-LNCc ($p < 0.05$) by one-way ANOVA analysis.....67
- Figure 6.** Cell viability of OSCC cell line by MTT analysis. SCC-25 cells were seeded on a 96-well plate on the following final curcumin concentrations: 5, 10, 20 μ M. The plates were incubated for (a) 24 h; (b) 48 h and (c) 144 h. Groups evaluated: LNCc (curcumin-loaded lipid-core nanocapsule), CLNCc (Chitosan-

coated curcumin-loaded lipid nanocapsule), CUR (curcumin solution in 1% (v/v) DMSO) and CLNC (blank lipid-core nanocapsule). Values represent mean \pm standard deviation (n = 6) Statistical Analysis: One way ANOVA followed by Post-hoc comparisons (Tukey Test) (p<0.05) *Significant different from the control group; #Significant different from CUR.....71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II: ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1. Physicochemical characteristics of the LNCc and CLNCc formulations.....	58
Table 2. Parameters obtained from <i>in vitro</i> release modeling on the model semi-empirical first order monoexponential.....	62
Table 3. Physicochemical characteristics of H-LNCc (hydrogel containing curcumin-loaded lipid-core nanocapsules) and H-CLNCc (hydrogel containing chitosan-coated curcumin-loaded lipid-core nanocapsules).....	63
Table 4. Results of mucoadhesion from Tensile Analysis of the different formulations.....	67
Table 5. Irritation Score of the different formulations obtained by the hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM)	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
3.1 Via de administração bucal e mucoadesão.....	31
3.2 Gel termorreversível.....	33
3.3 Uso de nanocápsulas poliméricas com finalidade mucoadesiva.....	35
3.4 Incorporação de nanocápsulas em hidrogéis.....	39
3.5 Curcumina e câncer de Boca.....	41
4. CAPÍTULO II. ARTIGO CIENTÍFICO	
<i>Thermosensitive and mucoadhesive hydrogel containing curcumin loaded lipid core nanocapsules coated with chitosan for buccal cancer treatment.....</i>	43
Abstract.....	45
1. Introduction	46
2. Materials and Methods.....	48
2.1. Materials.....	48
Chemicals.	48
Cell culture.....	48
Chicken fertilized eggs and porcine oral mucosa.....	49
2.2 Preparation of lipid-core nanocapsules.....	49
2.3 Physicochemical characterization of lipid-core nanocapsules.....	49
2.3.1 Particle size measurements.....	49
2.3.2 Zeta Potential.....	50

2.3.3 Determination of pH.....	50
2.3.4 Analytical methodology for curcumin quantification.....	50
2.3.5 Drug content and encapsulation efficiency.....	51
2.3.6 Morphology.....	51
2.4 Determination of curcumin <i>in vitro</i> release profile.....	52
2.5 Production of thermosensitive hydrogel.....	53
2.6 Thermosensitive hydrogel characterization.....	53
2.6.1 Determination of the sol-gel temperature.....	53
2.7 Mucoadhesion evaluation.....	54
2.7.1 Washability profile.....	54
2.7.2 Tensile analysis of nanocapsules suspensions and hydrogels.....	54
2.8 Determination of irritant potential.....	55
2.9 <i>In vitro</i> cytotoxicity of curcumin-loaded lipid-core nanocapsules.....	56
2.9.1 Cell culture.....	56
2.9.2 Mitochondrial activity evaluation (MTT Assay)	56
2.10. Statistical Analysis	57
3. Results and discussion.....	57
3.1 Physicochemical characterization of the curcumin-loaded lipid-core nanocapsules.....	57
3.2 Determination of <i>in vitro</i> release profile	61
3.3 Hydrogel Physicochemical Characterization.....	63
3.4 Mucoadhesion Test.....	65
3.4.1 Washability Profile	65
3.4.2 Tensile Stress Analysis.....	67
3.5 <i>In vitro</i> study of irritation (HET-CAM assay)	68
3.6 Cytotoxicity assays	69
4. Conclusions	72
5. Special Acknowledgments.....	72
6. Conflict of Interest.....	73
7. References.....	73

5.DISSCUSSÃO GERAL.....	81
6.CONCLUSÕES.....	91
7.REFERÊNCIAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

A via de administração bucal é uma via de administração indicada para aplicação de substâncias ativas na membrana da mucosa bucal, com finalidade tópica ou sistêmica, dependendo do caso. Histologicamente, a membrana bucal é formada por células epiteliais e permanece altamente hidratada e vascularizada. A hidratação é devida ao contato permanente com o muco, que oferece proteção e lubrificação. O muco é um meio constituído por água majoritariamente (cerca de 90%), lipídios, sais inorgânicos e proteínas, como a mucina. A mucina é uma das proteínas mais amplamente encontrada no muco, sendo esta a responsável pela estrutura do muco ser semelhante a um gel. A via bucal é uma via de aplicação que pode ser empregada para fármacos e substâncias ativas com ação anti-inflamatória e antitumoral. Entre as vantagens desta via encontra-se uma fácil acessibilidade, tanto para administrar o fármaco como para posterior remoção, baixa atividade enzimática e boa adequação para liberação controlada, assim como uma rápida recuperação celular (Tran et al., 2019).

Contudo, esta via de administração apresenta várias limitações, entre as quais destacam-se um *clearance* rápido, aproximadamente de 6 horas, tempo referente à renovação do muco na boca, o ato de engolir que é um mecanismo de reflexo, uma limitada área superficial e a própria presença da mucosa que interage com alguns fármacos devido a interação entre os grupos de hidrogênio e os grupos funcionais amino, com cargas aniônicas das proteínas presentes na mucosa (Chatterjee et al., 2017). Levando em consideração estas limitações é recomendado desenvolver formulações que permitam que os fármacos sejam entregues efetivamente e retidos por períodos de tempo maiores, permitindo uma liberação apropriada e controlada (Ferreira et al., 2019).

Produtos de origem vegetal tem adquirido um interesse especial na terapia de inúmeras doenças por apresentarem menos efeitos adversos do que as substâncias empregadas atualmente. A curcumina é um polifenol isolado do rizoma da *Curcuma longa* Linn (*Zingiberaceae*) que apresenta múltiplos benefícios na terapêutica, como diminuição da proliferação celular em diversos tipos de câncer, por exemplo, o câncer de mama, colorectal, de pulmão, de próstata e de boca (Prasad et al., 2014). Outras atividades biológicas atribuídas

são a atividade antioxidante, reparadora de tecidos, antiinflamatória e bactericida (Rabinarayan et al., 2015; El-Malek et al., 2017)

Apesar do potencial terapêutico da curcumina, este polifenol apresenta fotossensibilidade e instabilidade química em meio alcalino e neutro, sendo estável na faixa de pH entre 3,0 e 5,0. De acordo com a classificação biofarmacêutica a curcumina é uma molécula tipo IV, apresenta baixa solubilidade e baixa permeabilidade (Amidon et al., 1995). Devido a esta natureza hidrofóbica e difícil de solubilizar em meio fisiológico, sua biodisponibilidade é baixa (Zhen et al., 2014).

Devido às razões previamente mencionadas, a nanotecnologia é uma alternativa muito interessante para contornar as limitações apresentadas por algumas substâncias de origem vegetal, como a curcumina. A nanoencapsulação permite o aumento da estabilidade química e solubilidade aparente em água destas substâncias, além de modular a velocidade de liberação, fazendo deste um tratamento mais eficiente e com menos efeitos adversos. Adicionalmente, a degradação enzimática também pode ser prevenida (Yadav et al., 2010; El-Malek et al., 2017).

Na atualidade novos sistemas estão sendo desenvolvidos e estudados. Em particular as nanocápsulas de núcleo lipídico tem adquirido um interesse especial por apresentarem características fisico-químicas únicas, como, por exemplo, maior controle na liberação de fármacos, permitindo diminuir a dose de administração (Chaves et al., 2017). Levando em consideração o uso tópico em mucosas da curcumina incorporada nesta classe de nanocápsulas, a incorporação de polímeros mucoadesivos torna-se relevante. Tendo-se isto em vista o uso de biopolímeros mucoadesivos como a quitosana podem ser uma alternativa. Em estudos prévios do grupo de pesquisa tem-se demonstrado que nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana apresentam maior retenção de substância ativa em mucosas em comparação ao fármaco livre (Frank et al., 2014).

Levando em consideração as limitações previamente mencionadas apresentadas pela via bucal, é essencial desenvolver uma formulação contendo polímeros com propriedades que integrem um sistema efetivo para aumentar o

tempo de permanência da formulação na mucosa bucal. Neste contexto, os polímeros Poloxamer® 407 e o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), podem ser empregados a fim de se produzirem hidrogéis que através do aumento da viscosidade podem ficar mais tempo em contato com a mucosa bucal.

Hidrogéis são comumente utilizados para aplicação tópica e dentre os polímeros formadores de hidrogéis cita-se o uso de Poloxamer® 407 para desenvolver sistemas de geleificação *in situ*. Este polímero tem a propriedade de gelificar reversivelmente quando é exposto a um ambiente aquecido (Mouftah et al., 2016). Adicionalmente, a HPMC, um derivado hidrofílico da celulose, é classificada como um agente mucoadesivo de primeira geração. Este polímero tem sido utilizado em formulações microparticuladas para modular os perfis de liberação de fármacos, levando-se em consideração que quando é contornado por soluções aquosas tem a tendência de expandir lentamente seu volume (Zatta et al., 2018).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver e caracterizar um hidrogel mucoadesivo contendo nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana e contendo curcumina para aplicação bucal, como uma alternativa para o tratamento de diversas doenças, nas quais se inclui o câncer epidermóide bucal.

A presente Dissertação de Mestrado será apresentada na forma de dois capítulos. No primeiro capítulo encontra-se a revisão de literatura e o no segundo capítulo a metodologia, os resultados obtidos e a discussão destes resultados apresentados em forma de artigo. Para facilitar a leitura do artigo ele foi disposto em uma única coluna. Adicionalmente, as figuras e tabelas serão apresentadas ao longo do trabalho, para tornar a leitura e análise dos resultados mais cômoda.

2. OBJETIVOS

GERAL

- Desenvolver e caracterizar um hidrogel termorreversível e mucoadesivo contendo nanocápsulas de núcleo lipídico de curcumina revestidas com quitosana visando administração bucal como uma alternativa para o tratamento de diversas doenças, nas quais se inclui o câncer epidermóide bucal.

ESPECÍFICOS

- Desenvolver e caracterizar suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina, revestidas ou não revestidas com quitosana.
- Estudar o perfil de liberação *in vitro* da curcumina a partir das formulações desenvolvidas.
- Avaliar o perfil de morte celular de células de carcinoma epidermóide bucal *in vitro* frente à suspensão de nanocápsulas revestidas com quitosana e contendo curcumina.
- Desenvolver e avaliar físico-quimicamente hidrogéis termorreversíveis e mucoadesivos contendo as formulações de nanocápsulas desenvolvidas.
- Avaliar as características de mucoadesão das diferentes formulações desenvolvidas empregando lavabilidade em mucosa bucal suína e análise de textura.
- Determinar a influência das partículas adicionadas no hidrogel nas características de termorreversibilidade da formulação final através de estudo reológico.

3. *CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

3.1 Via de administração bucal e mucoadesão

A cavidade bucal é uma barreira física para o exterior, contém a língua, a mucosa e as glândulas salivares. A língua tem um papel essencial nas funções da cavidade bucal no que diz respeito à mastigação, fonação e gosto. Tem no seu núcleo músculo esquelético e tecido conectivo que permite realizar movimentos coordenados para realizar suas funções. Possui na sua superfície um epitélio especializado que confere uma aparência única e uma função sensorial, assim como as papilas que são as responsáveis pela textura felpuda da língua. As glândulas salivares, majoritariamente, a parótida, submandibular e a sublingual, secretam continuamente fluidos de natureza proteica (ricos em serina e mucina) que são necessários para manter a região hidratada para seu correto funcionamento (Qin et al., 2017).

A mucosa da cavidade bucal é um epitélio com sub-regiões, cada uma com diferenças na queratinização, assim como na espessura do tecido e o tempo de renovação celular. A mucosa bucal tem se destacado como um local para a administração de fármacos, devido à conveniência de administração e fácil acesso para a liberação de agentes terapêuticos, seja para ação local ou sistêmica. Além da extensiva irrigação, o acesso direto para a circulação sistêmica através da veia jugular torna esta via uma alternativa para a liberação de fármacos que apresentam extenso metabolismo pré-sistêmico, conduzindo a um aumento da biodisponibilidade desses fármacos (Hassan et al., 2009). O efeito do *clearance* salivar e a deglutição acidental da forma farmacêutica, bem como as propriedades de barreira da mucosa bucal se destacam como as principais limitações para o desenvolvimento de formas farmacêuticas para administração nesta via. Entretanto, a utilização de sistemas mucoadesivos, bem como de promotores de absorção têm sido apresentado como alternativas para contornar esses obstáculos (Sudhakar et al., 2006).

Na atualidade, têm sido desenvolvidas diversas formas farmacêuticas como comprimidos, filmes orais, géis e unguentos (Salehi & Boddohi, 2017; Puri et al., 2019) que podem ser administrados na área sublingual, bucal, gengival e/ou palato mole. Adicionalmente, formulações bioadesivas são desenvolvidas frente a formulações já existentes para se obter respostas terapêuticas mais favoráveis, como é o caso dos sistemas sólidos multiparticulados, sistemas líquidos como as microemulsões, e dos sistemas semissólidos como os hidrogéis (Morales & Brayden, 2017a).

A bioadesão se define como o estado em que dois materiais são mantidos interagindo por um período de tempo, sendo pelo menos um destes de natureza biológica. Com frequência, os termos bioadesão e mucoadesão são utilizados

indistintamente, porque no segundo caso a interação ocorre com uma camada de muco. Para a administração de formas farmacêuticas em mucosas, a capacidade de mucoadesão apresentada por estas formulações pode aumentar o tempo de permanência destas no local, além de permitir uma liberação controlada das substâncias incorporadas (Carvalho et al., 2010).

O mecanismo de mucoadesão é dividido geralmente em dois estágios, o estágio de contato e o estágio de consolidação. O primeiro estágio tem como característica o contato entre ambas superfícies; neste momento ocorre a expansão e o espalhamento da formulação iniciando o contato com as camadas de muco. No segundo estágio os materiais mucoadesivos envolvidos com a umidade do entorno, permite que as moléculas dos polímeros mucoadesivos se separem e estabeleçam ligações de hidrogênio e Van der Waals com a superfície (Puri et al., 2019).

Os estudos de mucoadesão são desenvolvidos desde a década de 80, contudo, ainda não fica claro o mecanismo integral da mucoadesão (Borges et al., 2015). Diversas teorias têm sido propostas, entre as quais mencionam-se as seguintes teorias: Intumescimento (os polímeros espalham-se e penetram nas camadas superficiais e no muco), adsorção (ocorre uma adesão entre o muco e o polímero obtida por interações intermoleculares: primeiramente ligações iônicas, covalentes e metálicas, seguidamente forças adesivas secundárias como ligações hidrogênio, Van der Waals e interações hidrofóbicas), eletrônica (a adesão é devida à transferência de elétrons pela diferença das cargas eletrônicas entre o polímero mucoadesivo e a membrana da mucosa, criando assim uma dupla camada de atração eletrostática), sendo no caso, que os polímeros adesivos normalmente possuem carga positiva a mucina possui carga residual negativa, fratura (a teoria que relaciona ligações adesivas entre os sistemas com a força requerida para separar uma superfície da outra), difusão (processo que propõe uma difusão das cadeias poliméricas até a rede polimérica das glicoproteínas das camadas do muco e vice-versa, formando uma camada de interpenetração, quantificada pelo coeficiente de difusão) (Zhu et al., 2013; Carvalho et al., 2014a).

O principal diferencial de formas mucoadesivas é o aumento do tempo de permanência da formulação no local de aplicação, o que facilita a difusão do fármaco, melhorando a absorção do mesmo e a distribuição sistêmica ou mesmo a ação local. Polímeros são frequentemente utilizados com a finalidade de proporcionar mucoadesividade às formulações, estes são geralmente solúveis em água e, quando secos, são capazes de absorver água da superfície biológica levando à formação de um gel, que, pela interação das cadeias poliméricas com o muco, facilita a adesão junto à mucosa; essas interações podem ser ligações do tipo iônica, ligações de hidrogênio,

forças de Van der Waals e hidrofóbicas (Carvalho et al., 2014b). Além disso, os polímeros formam soluções aquosas viscosas que aumentam o tempo de retenção da forma farmacêutica sobre a superfície mucosa, intensificando a bioadesão (Lyra et al., 2007). Entre os polímeros que apresentam essas características e que podem ser utilizados pela via bucal, destacam-se os derivados do ácido poliacrílico, os derivados da celulose (HPMC, HPC, HEC), as gomas (xantana, guar), a quitosana entre outros (Sudhakar et al., 2006).

Sheshala e colaboradores (2018) desenvolveram uma formulação contendo moxifloxacina em um hidrogel de gelificação *in situ*, para o tratamento da periodontite, objetivando a aplicação bucal, utilizando 15-21% Poloxamer[®] 407, 0-2% Poloxamer 188 e 0,2-0,5% HPMC, em diferentes concentrações para encontrar a formulação mais ótima para fins de aplicação na mucosa bucal. Após produção e caracterização encontram-se os hidrogéis nos parâmetros físico-químicos aceitos, avaliou-se e comparou-se a influência da concentração dos polímeros na liberação do fármaco mediante um estudo de liberação *in vitro* com membrana de diálise. Os hidrogéis contendo 21% de Poloxamer[®] 407, 2% Poloxamer 188 foram os mais indicados obtendo liberação sustentada por 8h (73%); Avaliou-se a influência da adição do HPMC em 0,5%, aumentando a retenção na mucosa favorecendo na mucoadesão, assim mesmo o HPMC é um agente retardador da liberação do fármaco (62%) no mesmo período de tempo, assim mesmo observou-se que incluir este polímero na formulação teve a capacidade de diminuir em um 22% a liberação burst durante a primeira hora do experimento. Contudo, a mucoadesividade das nanopartículas foi maior do que dos polímeros mucoadesivos de referência indicando que, além da mucoadesividade do material a área superficial das nanopartículas também impacta positivamente na mucoadesividade (Sheshala et al., 2018).

3.2 Gel Termorreversível

Hidrogéis são redes poliméricas de natureza hidrofílica que têm uma configuração tridimensional capaz de reter grandes volumes de água conservando sua estrutura. Eles entumescem em meios aquosos devido aos diversos grupos funcionais presentes nas suas cadeias poliméricas, podendo apresentar hidroxilas, carboxilas, grupo amino ou ácido sulfônico nos restos das redes poliméricas (Koetting et al., 2015). O perfil de liberação de substâncias incorporadas em hidrogéis pode ser controlado ajustando o conteúdo de água, a composição dos polímeros, a cristalinidade e a densidade de ligações cruzadas (*cross linking*) (Puri et al., 2019).

Os hidrogéis têm sido utilizados em diversas aplicações farmacêuticas, incluindo a via parenteral (Álvarez et al., 2016), oftálmica (Almeida et al., 2014), intranasal (Kaur et al., 2015), retal (Shen et al., 2015), vaginal (Ci et al., 2017) e bucal (Ferreira et al., 2019). Uma das abordagens desta dissertação é o uso dos sistemas termosensíveis com gelificação *in situ* sob um estímulo específico. Há géis termoreversíveis, possuem como característica principal uma transição do seu estado sol-gel que varia em função da temperatura. Sendo assim, a forma farmacêutica é administrada em estado líquido e, quando entra em contato com a mucosa bucal, ocorre a interação das cadeias do polímero com a camada de muco atingindo um equilíbrio térmico e promovendo a gelificação (Kaur et al., 2015).

Os Poloxâmeros são uma família de polímeros anfífilos não iônicos sintéticos, constituídos quimicamente por um bloco de copolímero com segmentos de óxido de polipropileno hidrofóbico (PPO) e óxido de polietileno hidrofílico (PEO) (Figura 1). O Poloxamer® 407 tem massa molecular de 12,6 kDa. A conversão sol-gel ocorre devido às interações hidrofóbicas entre as cadeias dos copolímeros, à medida que aumenta a temperatura estas cadeias começam a se agregar neste processo endotérmico, passando a formar micelas, cabe mencionar que esta micelização ocorre quando a concentração de Poloxamer® 407 supera a concentração micelar crítica (CMC), e o resultado deste fenômeno, é a desidratação do núcleo formado por PPO e a hidratação dos blocos de PEO. A temperatura na qual ocorre a transição sol-gel pode variar de acordo com as concentrações de poloxâmero utilizadas na formulação, sendo desde 10 % a 20 % (m/v) as porcentagens necessárias para atingir uma temperatura de transição sol-gel próxima à temperatura corporal. Este ponto onde ocorre a gelificação pode ser modulado com a associação de outros poloxâmeros, particularmente o P188 (Giuliano et al., 2018b).

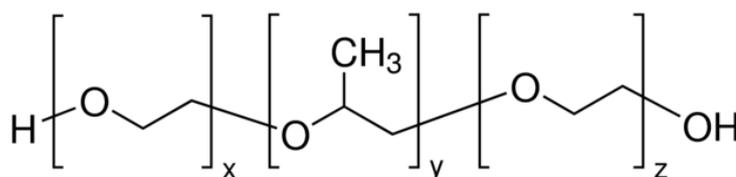


Figura 1. Estrutura química do Poloxamer® 407. Copolímero formado por três blocos. x: Bloco de PEO (Óxido de polietileno); y: Bloco de PPO (Óxido de polipropileno); z: Bloco de PEO (Óxido de polietileno).

Quando o sistema atinge o estado gel, formam-se núcleos cúbicos ou hexagonais com estrutura organizada, que permite solubilização de substâncias tanto hidrofílicas como lipofílicas. A distribuição final deste sistema permite que substâncias lipofílicas permaneçam em suspensão na parte hidrofóbica, junto ao PPO, e que substâncias hidrofílicas, como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), interajam com a

porção PEO. Adicionalmente, a adição de HPMC neste tipo de formulação pode promover o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos, puesto que os sistemas de gelificação *in situ* são conhecidos por possuir uma baixa propriedade mucoadesiva (Rençber et al., 2017), com a adição do HPMC as formulações sofrem diminuição do valor da sua concentração micelar crítica, sendo preciso uma quantidade menor de poloxamer para atingir a sua gelificação, assim mesmo aumenta a sua viscosidade (Arafa et al., 2018).

Dentre as vantagens que esta gelificação *in situ* fornece, estão a fácil administração e entregue das substâncias ativas no sitio de aplicação ocorrendo o espalhamento da formulação no seu estado sol. Após contato com a mucosa, a formulação torna-se mais viscosa consolidando-se no seu estado transitório gel permitindo assim uma liberação mais controlada, diminuindo dessa forma, o tempo de *clearance* em comparação com os métodos de entregue de fármacos convencionais (Ferreira et al., 2016; Fakhari et al., 2017).

Marques e colaboradores (2018) realizaram um estudo experimental desenvolvendo um gel mucoadesivo com base de Carbopol 980 ao 1.5% (m/v) contendo ibuprofeno nanoparticulado para ser administrado na mucosa bucal em uma concentração de 0,125%, m/v, indicado para o tratamento de inflamações. Os autores desenvolveram as dispersões de nanopartículas lipídicas contendo o fármaco pelo método de sonificação e incorporaram no gel mediante dispersão mecânica. Avaliaram os perfis de liberação do fármaco a partir do hidrogel tanto de fármaco nanoencapsulado quanto do fármaco na forma livre, utilizando membranas de diálise em meio simulador salivar, mantendo a condição *sink*. Após colheitas em tempos predeterminados trataram se as amostras para ser analisadas utilizando quantificação por espectrofotometria UV-VIS. Quanto aos resultados a liberação foi imediata na forma livre, com liberação de 100% de ibuprofeno após 6h, e observou-se liberação sustentada de 40% de fármaco nesse mesmo período. Indicando a importância de associar fármacos em sistemas que sejam capazes de retrazar a liberação do fármaco enquanto a estrutura tridimensional que confere o hidrogel para prolongar o tempo de residência do ibuprofeno na mucosa (Marques et al., 2018).

3.3 Uso de nanocápsulas poliméricas com finalidade mucoadesiva

Por definição, sistemas nanoparticulados são estruturas coloidais com diâmetro entre 100-1000 nm, os quais apresentam inúmeras vantagens, como o controle da liberação de fármacos (em especial sistemas contendo núcleo oleoso), a melhora na

eficácia terapêutica, a redução da degradação química de substâncias e da toxicidade, e, além de melhorar a biodisponibilidade, também alteram a distribuição e o *clearance* de fármacos (Pohlmann et al., 2013).

Dentro da família dos carreadores de fármacos menciona-se os sistemas micro e nanoparticulados, dentre os carreadores nanoparticulados pode-se citar as nanopartículas lipídicas sólidas e as nanopartículas poliméricas, tanto nanocápsulas quanto nanoesferas. Na atualidade, estudos apontam para a melhora da permeação de fármacos através da mucosa bucal quando substâncias são administradas e estão vinculadas a sistemas nanométricos (Morales et al., 2013), pois a nanoencapsulação é capaz de contornar a baixa solubilidade em fluidos biológicos de alguns fármacos, além de controlar seu perfil de liberação. Adicionalmente, a barreira polimérica formada pela parede das nanocápsulas é capaz de proteger os fármacos frente à degradação por oxidação e exposição à luz UV (Weber et al., 2016).

Como citado anteriormente, as nanopartículas poliméricas podem ser classificadas em dois grandes grupos, as nanoesferas, que são sistemas poliméricos matriciais, e as nanocápsulas, que são sistemas reservatório. Dentro do grupo das nanocápsulas destacam-se as nanocápsulas de núcleo lipídico, estas são formadas por um núcleo contendo um lipídio sólido disperso num lipídio líquido contornado por uma parede polimérica (poli-(ϵ -caprolactona)). Em geral o lipídio líquido empregado são os triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC), porém novas alternativas de núcleo oleoso têm sido adotadas, como, por exemplo, o óleo de semente de uva, que permite a solubilização de substâncias pouco solúveis em TCC, como a curcumina (Coradini et al., 2014). Estes nanocarreadores apresentam diâmetro médio entre 200 e 300 nm, apresentando assim um diâmetro adequado para sua permeação através das camadas de mucosa bucal suína (Morales & Brayden, 2017a).

Para qualquer via de administração, uma permeação satisfatória através das membranas depende tanto das propriedades físico-químicas da substância quanto das propriedades das próprias membranas. Sistemas carreadores de fármacos podem direcionar as substâncias ativas ao seu sítio alvo devido a sua diferente interação com as membranas celulares (Morales & Brayden, 2017b). O diâmetro destes nanocarreadores é um fator que influencia sua permeação através de mucosas, por exemplo. Teubl e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas poliméricas de carboxipoliestireno, e após caracterização do diâmetro médio os autores determinaram o perfil de permeação de nanopartículas de 200 nm através da mucosa bucal suína em comparação com nanopartículas de menor diâmetro (25-50 nm), obtendo seus

coeficientes de difusão através de um estudo de permeação *ex vivo* utilizando células de difusão padronizadas. Os autores concluíram que as nanopartículas de maior diâmetro foram capazes de penetrar mais rapidamente e profundamente nos estratos da mucosa bucal. O mecanismo ainda não é bem definido, mas tem relação com as estruturas anatômicas e biofísicas da mucosa bucal, entre elas a camada de muco e a micropregas, uma dobra em forma de sulco que tem diâmetro entre 200 a 500 nm, sendo o tamanho ideal para as nanopartículas maiores se depositarem e apresentarem uma maior taxa de absorção que é conduzida pela cinética de difusão, no caso da absorção por difusão passiva, e forças de direcionamento termodinâmico (Teubl et al., 2013).

Quando objetiva-se aumentar o tempo de permanência das formulações no seu local de aplicação, estratégias tecnológicas podem ser empregadas, como, por exemplo, o uso de materiais mucoadesivos. O desenvolvimento de nanopartículas revestidas com polímeros mucoadesivos pode aumentar o tempo de retenção e, conseqüente, a penetração/permeação das substâncias ativas através de mucosas. Uma estratégia interessante neste sentido é o uso de polímeros com natureza catiônica que permitem uma adequada interação com os resíduos de ácido siálico da mucina no epitélio bucal. Estudos prévios têm comparado o efeito da carga elétrica na permeação comparando nanopartículas aniônicas com nanopartículas catiônicas, sendo a nanopartícula com carga catiônica a que apresenta maiores quantidades de permeação em mucosa bucal suína, devido às cargas catiônicas reagindo com os resíduos aniônicos da mucina (Morales & Brayden, 2017b).

Dentre os polímeros catiônicos, destaca-se a quitosana (Figura 2). Este polímero por ser biodegradável e biocompatível tem sido utilizado em diversos campos da pesquisa, tendo bastante destaque na área da tecnologia farmacêutica. Quimicamente, a quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina, um dos mais abundantes no planeta depois da celulose, presentes nos exoesqueletos de crustáceos e outros artrópodos, assim como moluscos (Hamed et al., 2016). Tem elevada solubilidade em soluções ácidas, devido à ionização dos grupamentos amino, e, conseqüentemente, conferindo caráter policatiônico a esse polímero. Seu caráter policatiônico facilita sua interação com resíduos carregados negativamente presentes na superfície celular, como por exemplo, os resíduos de ácido siálico presente nas mucoproteínas (Singh et al., 2017).

Além disso, a quitosana é um polímero capaz de formar filme é empregado para produção de gel, conferindo características mucoadesivas adequadas a essa macromolécula (Contri et al., 2010). Seu mecanismo de mucoadesão é devido à

interação química entre os cátions deste polímero e as cargas aniônicas da mucina permitindo uma elevada força de interação entre estas diferentes superfícies. Além dessas características, a quitosana também é conhecida por promover a abertura das junções apertadas celulares de forma transitória o que pode promover a permeação de fármacos através de membranas (Contri et al., 2010). Nosso grupo de pesquisa já vem estudando o uso de quitosana como polímero de revestimento para nanocápsulas de núcleo lipídico visando aumentar a mucoadesão destes sistemas.

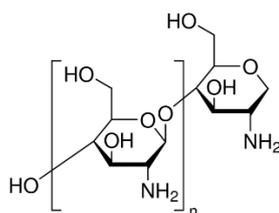


Figura 2. Representação da estrutura química da quitosana.

Materiais mucoadesivos podem ser utilizados também como agentes terapêuticos já que têm a capacidade de formar filmes sobre superfícies lesadas, protegendo assim os tecidos danificados e, adicionalmente, a quitosana apresenta potencial como agente bacteriostático (Kouchak et al., 2015).

Kang e colaboradores (2017) desenvolveram nanopartículas de PLGA e Poloxamer[®] 188 revestidas com quitosana contendo Albendazol para o tratamento de câncer com finalidade de ser administrado pela via oral. As nanopartículas foram obtidas pelo método de difusão de solvente e a solução de quitosana para o revestimento foi testada em concentrações de 0,5; 1; e 2 mg.mL⁻¹. Após a caracterização físico-química foi realizado um estudo de mucoadesão pelo método da partícula de mucina, um estudo que avalia a diferença do potencial zeta quando partículas de mucina em solução são misturadas com os grupos em volumes iguais. Observou-se aumento no potencial zeta no grupo com maior concentração de quitosana (P188CS2), aumentando de $-5,51 \pm 0,18$ mV para $-4,21 \pm 0,42$ mV, isso devido a este grupo possuir maior carga catiônica da quitosana que interage eletrostaticamente com os de ácido siálico presente na solução de mucina (Kang et al., 2017).

Outro polímero utilizado em sistemas mucoadesivos é a HPMC, um derivado hidrofílico da celulose, classificado como um agente mucoadesivo de primeira geração. É um polímero não iônico, não irritante e resistente à degradação enzimática, de fácil incorporação nas formulações estável na faixa de pH entre 3 e 11. Seus grupos hidroxilos interagem com os grupos aminos das glicoproteínas presentes mucina via ligação de hidrogênio (Chatterjee et al., 2017). Por ser não iônico é menos reativo frente

à mucina pela ausência de grupos protonados, e conseqüentemente, menos mucoadesivo do que outros polímeros que possuem dita característica. Mesmo assim, este polímero têm sido utilizado para modular os perfis de liberação dos fármacos pois quando em solução aquosa tem a tendência de expandir seu volume, controlando a difusão de fármacos através dele (Zatta et al., 2018).

3.4 Incorporação de Nanocápsulas em Hidrogéis

Nos últimos anos, a incorporação de sistemas carreadores de fármacos em hidrogéis tem sido objeto de diversas pesquisas. Esta associação justifica-se, pois novas perspectivas surgem ao se associar diversas tecnologias em uma única formulação, bem como para sobrepor desvantagens que alguns sistemas apresentam sem esta associação. Por exemplo, uma das limitações dos hidrogéis é possuir um curto tempo de residência no local de aplicação, devido a sua rápida dissolução em meio aquoso e em fluidos biológicos, e para sobrepor esta limitação pode-se empregar a associação com sistemas nanoestruturados.

Arafa e colaboradores (2015) desenvolveram um gel *in situ* de nanopartículas contendo oro para o tratamento de queimaduras tópicas. Incorporados em uma base contendo 15% (m/v) de Poloxamer® (PLX) 407 e 15% (m/v) de Poloxamer® (PLX) 407 e 1% (m/v) de HPMC. Após caracterização tanto das nanopartículas de oro como dos hidrogéis. Determinaram-se seus perfis de liberação *in vitro* utilizando células de difusão em meio fosfato pH 7,4. Assim mesmo, avaliou-se a permeação *ex vivo*, realizado pela técnica da célula de difusão de Franz, utilizando a mesma composição do meio e pele dorsal de ratos previamente cortada. Após coletas em tempos determinados as amostras de ambos experimentos foram tratadas e quantificadas via espectrofotometria UV-VIS. Para o hidrogel desenvolvido sem e com HPMC obteve-se perfil de liberação de 100% e 98,3% em 6 h, respectivamente. Enquanto os valores de fluxo de permeação são 0.2974 ± 2.85 e 0.2649 ± 1.43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ para ditos grupos, respectivamente. Indicando uma presença contínua das nanopartículas até 5 h. Demonstrando que este sistema binário mantém uma retenção no tecido e que possui uma liberação controlada das nanopartículas e um efeito viável para uso tópico (Arafa et al., 2015).

No mesmo estudo, avaliou-se a contagem bacteriana e reparadora de tecido *in vivo* em comparação com um produto comercial em ratos com queimaduras previamente induzidas. Os resultados da contagem bacteriana nos tecidos do grupo dos hidrogéis foi indetectável após 5 dias de análise em contraste com os grupos

administrados com o controle que tinham contagem após 9 dias de análise. As formulações desenvolvidas apresentaram valores maiores de propriedades reparadoras de tecidos, pois observou-se uma diminuição constante no diâmetro das lesões presentes nos ratos e completa recuperação após 10 dias de tratamento. significativamente diferente com as amostras dos grupos administrados com o tratamento convencional. Finalmente, os estudos histopatológicos mostraram tecidos saudáveis nos grupos tratados com os géis, enquanto os tratados com os tratamentos convencionais mostravam sinais de trauma após as autopsias. Desta forma, concluiu-se que os hidrogéis são candidatos para carregar nanopartículas apresentando melhores perfis na sua liberação em comparação com as nanopartículas de ouro per se, e melhoras na permeação da pele, e seu efeito terapêutico como antibiótico e reparador de tecidos lesados por queimaduras (Arafa et al., 2015).

Esposito e colaboradores (2013) desenvolveram e caracterizaram físico-quimicamente formulações de carregadores lipídicos nanoestruturados contendo clotrimazol indicado para infecções fúngicas, que foram incorporados em um hidrogel de 24% Poloxamer® 407 com aplicação pela via oral ou vaginal. Obtiveram-se dispersões no hidrogel com fácil aplicação na mucosa e adequada viscosidade após gelificação, controlando a difusão do fármaco. Avaliaram a permeação *ex vivo* para estudar este parâmetro pela técnica Célula de Franz utilizando como meio fosfato pH 7,4 reforçado com etanol:água 20:80, os resultados obtidos após tratamento das alíquotas e dos dados o coeficiente de difusão foi de 3.101 e 1.812 para o Gel de Clotrimazol Livre e para o Gel de Clotrimazol Nanoencapsulado, respectivamente. Sendo estes significativamente diferentes indicando uma difusão mais para o último caso. O uso dos sistemas nanocarreadores também evidenciou taxas de difusão mais imponentes do que as obtidas com o controle de uso convencional no mercado também testado, que obteve um índice de 2.469. Além disso, avaliaram o efeito antifúngico contra *Candida albicans in vivo* das nanocápsulas e do fármaco livre. Demonstrou-se maior atividade das nanocápsulas com uma eficácia de 65.3% no que diz respeito ao fármaco livre, que apenas alcançou um 6,8%; tendo um efeito significativo só até multiplicando sua concentração por dez vezes. Demonstrando a importância da associação de encapsular fármacos lipofílicos e incorpora-los em hidrogéis para controlar sua liberação e assim obter um melhor efeito terapêutico (Esposito et al., 2013).

Adicionalmente, Hazzah e colaboradores (2016) desenvolveram e caracterizaram um gel mucoadesivo a base de Poloxamer® 407 em uma concentração de 10% (m/v), contendo nanopartículas lipídicas sólidas com a substância ativa curcumina (CurSLN-Gel) objetivando aplicação bucal para o tratamento de reparação

do tecido da mucosa em lesões pré-cancerosas. Realizou-se o teste de permeação com a célula de Difusão de Franz utilizando mucosa bucal de frango previamente tratada, após 3 h a mucosa foi coletada e a curcumina extraída para posterior quantificação. Os autores observaram uma maior quantidade da substância ativa acumulada nos extratos da mucosa que foi tratada com a formulação CurSLN-Gel, cerca de 21%, em contraste com os outros grupos analisados CurSLN em dispersão com mucina, Cur-Gel, Cur-Suspensão, que apresentaram uma quantidade de curcumina retida na mucosa igual a 18%, 2% e 2%, respectivamente, indicando que a formulação proposta tem capacidade de aumentar a retenção de curcumina na mucosa (Hazzah et al., 2016).

Na sequência, foi conduzido um estudo *in vivo* em pacientes com lesões na mucosa bucal, os pacientes foram divididos em dois grupos: Um deles foi tratado com o Gel com curcumina sem o sistema nanoparticulado (Cur-Gel) e o outro grupo foi tratado com o Gel com as nanopartículas de curcumina (CurSLN-Gel) em uma dose de 6 mg de curcumina por dia, durante 6 semanas. Solicitou-se aos pacientes medir o valor de dor sentida através de uma escala visual numérica, o qual depois foi introduzida em uma fórmula para obter a índice de dor. Após observações semanais consecutivas os pacientes relataram uma diminuição da dor que foi refletida na diminuição do índice no grupo CurSLN-Gel em 90% após 10 dias de tratamento, em comparação com o Cur-Gel que teve um índice de 63,33% no mesmo tempo. Adicionalmente, houve uma diminuição no tamanho das lesões nos indivíduos tratados com o gel nanoparticulado, após 4 semanas de tratamento os autores observaram uma redução de 94,29% nas lesões (Hazzah et al, 2016).

3.5 Curcumina e Câncer de Boca

O câncer é uma doença de alta incidência no mundo. Essa doença pode acometer várias partes do corpo, inclusive a região da boca. De acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer), estimavam-se 15.210 novos casos de câncer de boca em 2020 no Brasil. Dentre os diferentes tipos de câncer bucal destaca-se o carcinoma de células escamosas bucal, também denominado carcinoma escamocelular, carcinoma epidermóide ou carcinoma espinocelular, que se origina no epitélio de revestimento, e sendo assim, pode afetar os lábios e/ou parte interior da cavidade bucal (Brener et al., 2007, MS / INCA / Estimativa de Câncer no Brasil, 2020).

O tratamento desse carcinoma pode ser realizado por cirurgia (estágio das lesões estão entre as fases III e IV) ou radioterapia e/ou quimioterapia (cisplatina, carboplatina, 5- fluorouracil, paclitaxel, docetaxel) (Brener et al., 2007). Contudo esse

último tipo de tratamento causa efeitos colaterais como: perda de apetite, perda de cabelo, náuseas, vômito, diarreia e baixa contagem de células sanguíneas. Tendo em vista a alta incidência de efeitos colaterais, a procura de novas opções terapêuticas, com maior tolerabilidade, menores efeitos adversos e com efeito semelhante é constante. Dessa forma, a curcumina se destaca como potencial produto de origem natural para o tratamento do câncer.

A curcumina (Figura 3) é um dos principais curcuminóides (77%) isolado do rizoma de *Curcuma longa* Linn *Zingiberaceae* (Basnet & Skalko-Basnet, 2011).

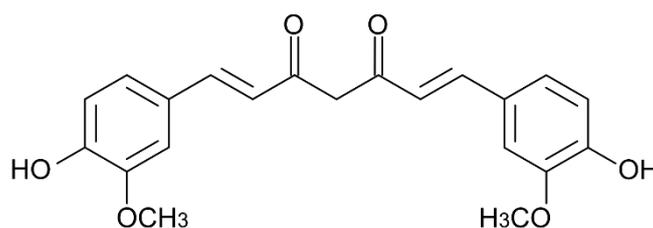


Figura 3. Estrutura química da curcumina.

O uso de curcumina para reduzir a contagem de células de câncer epidermóide bucal vem sendo estudado (H. M. Lee et al., 2016; Xiao et al., 2014). Esse potencial foi confirmado observando-se a redução da proliferação de células SCC-25 utilizando ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium], teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular) com exposição de 24 e 48 horas. No mesmo estudo, observou-se um aumento, em relação ao controle, de células na fase G2/M. Também foi possível observar uma diminuição dose-dependente, na migração de células através da membrana (capacidade de invasão). Além de inibir o crescimento e invasão, esse polifenol inibe a metástase via regulação negativa do receptor do fator de crescimento epidérmico em células cancerosas (Basnet & Skalko-Basnet, 2011).

A curcumina é um polifenol hidrofóbico e, dessa forma, apresenta dificuldade de se solubilizar em meio fisiológico, e por consequência apresenta baixa biodisponibilidade. Sua estabilidade é maior em pH entre 3,0 e 6,5 (Zlotogorski et al., 2013; Prasad et al., 2014). Além disso, a curcumina é instável frente à exposição à luz (Codevilla et al., 2015). Visto as limitações físico-químicas da curcumina, o uso de sistemas nanoestruturados permite aumento da estabilidade frente a pH alcalino, controle de liberação da substância e melhora da baixa solubilidade da curcumina (Lin et al., 2012; Nair et al., 2012). Além disso, esses sistemas permitem aumentar a eficiência terapêutica e reduzir a toxicidade (Song et al., 2011; Hu et al., 2015), devido à internalização dos nanocarreadores em células específicas através da utilização de ligantes direcionadores (Lee et al., 2014).

4. CAPÍTULO II. Thermosensitive and mucoadhesive hydrogel containing curcumin loaded lipid core nanocapsules coated with chitosan for buccal cancer treatment.

O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 45 – 78, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição do desenvolvimento e caracterização de um hidrogel termoreversível produzido a partir de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo curcumina revestidas com quitosana, para tratamento de diversas doenças visando aplicação bucal. Assim como a avaliação da sua eficácia, tolerabilidade e efeito mucoadesivo empregando diversas técnicas. Motivo pelo qual foi retirado da versão digital disponibilizada na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5. DISCUSSÃO GERAL

As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico desenvolvidas neste estudo foram nomeadas LNCc (formulação contendo curcumina) e CLNCc (formulação contendo curcumina e revestida com quitosana). As suspensões desenvolvidas apresentaram aspecto leitoso, de cor amarela, devido à presença de curcumina e efeito Tyndall, característico de sistemas coloidais. Essas suspensões foram desenvolvidas com óleo de semente de uva visto ser uma alternativa para a produção de formulações com curcumina, uma vez que é capaz de solubilizar esta substância. O uso desse óleo é uma das opções aos triglicerídeos de cadeia média que usualmente são utilizados na produção de nanocápsulas de núcleo lipídico (Coradini et al., 2014), contudo seu uso pode alterar a distribuição do tamanho de partícula. Levando-se isto em consideração, o diâmetro das formulações desenvolvidas foi analisado por diferentes técnicas complementares.

Essas determinações foram realizadas em comparação entre a CLNCc e LNCc. O $D(4,3)$, que indica o diâmetro médio em relação ao volume da esfera equivalente, foi determinado por difração de laser (DL) e indicou diâmetro de 173 ± 22 nm e 179 ± 48 nm para as formulações CLNCc e LNCc, respectivamente. Anteriormente Coradini e colaboradores (2014) desenvolveram nanocápsulas contendo curcumina e o diâmetro obtido foi 198 ± 6 nm, corroborando com os dados obtidos no presente estudo. As análises por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) indicam um aumento significativo ($p < 0,05$) do z-average após o revestimento com quitosana, os valores foram de 158 ± 10 nm para a formulação LNCc e de 200 ± 19 nm para a formulação CLNCc. O aumento de diâmetro após revestimento com quitosana foi previamente verificado por Bender e colaboradores (Bender et al., 2012). Os perfis de distribuição de ambas formulações, obtidos por ambas as técnicas, demonstraram que as mesmas são homogêneas, na faixa nanométrica, contudo após o revestimento observou-se aumento significativo do índice de polidispersão ($p < 0,05$), ou seja, houve uma redução da homogeneidade da formulação revestida, porém os valores foram em torno de 0,2, indicando se tratarem de formulações com distribuição de diâmetro homogêneo (Bender et al., 2012).

Os resultados da análise de rastreamento de partículas (NTA) corroboram com aqueles obtidos com as técnicas de análises de diâmetro demonstradas

anteriormente. Os valores de média, D(10), D(50) e D(90) confirmam o aumento do diâmetro após o revestimento ($p < 0,05$) e a homogeneidade no perfil de distribuição antes e depois do revestimento. Além disso, esta técnica permite avaliar o número de partículas contidas em cada formulação, quanto a este resultado não foi observada diferença estatística após revestimento ($p > 0,05$), uma vez que a adição da massa de quitosana é realizada após a formação das partículas.

Para comprovar o revestimento das nanocápsulas com o polímero catiônico quitosana o potencial zeta foi avaliado. A formulação LNCC apresentou potencial zeta igual a $- 18,60 \pm 0,50$ mV, valor negativo provavelmente devido a presença do Lipoid S75[®] e polissorbatato 80 (Cé et al., 2016) na formulação, já a suspensão CLNCC obteve potencial zeta positivo, igual a $+ 19,00 \pm 3,18$ mV, essa reversão do potencial zeta confirma o revestimento com quitosana (Bender et al., 2012). A característica policatiônica da formulação (devido o revestimento com quitosana) permite a interação com os resíduos aniônicos presentes na superfície das células escamosas bucal. Essa aplicação se mostra interessante dada às poucas opções terapêuticas que utilizam essa forma de aplicação, visando aumentar o tempo de permanência de formas farmacêuticas na mucosa bucal.

Com o intuito de aumentar o tempo de permanência na mucosa bucal, contornando as limitações desta via, as nanocápsulas desenvolvidas foram utilizadas para o desenvolvimento de hidrogéis termoreversíveis e mucoadesivos, para tanto os polímeros HPMC e Poloxamer[®] 407 foram adicionados diretamente nas suspensões de nanocápsulas, as formulações finais foram nomeadas H-LNCC (hidrogel contendo nanocápsulas de curcumina não revestidas) e H-CLNCC (hidrogel contendo nanocápsulas de curcumina revestidas com quitosana). O diâmetro foi avaliado por DL e PCS e os perfis de distribuição foram mantidos após incorporação dos polímeros nas suspensões de nanocápsulas.

As nanocápsulas apresentaram morfologia esférica e observou-se diâmetro de partícula semelhante aos resultados apresentados pelas técnicas mencionadas previamente. Não houve alteração na morfologia das nanocápsulas após incorporação nos hidrogéis. Semelhantemente, Siqueira e

colaboradores (2011) desenvolveram nanocápsulas de benzofenona-3 e incorporaram em hidrogéis de hidroxietilcelulose e observaram que a morfologia e o diâmetro das nanocápsulas não foi alterado (Siqueira et al., 2011).

O pH da formulação CLNCc foi menor que da formulação LNCc devido a solução ácida de quitosana utilizada para o revestimento das nanocápsulas. Em relação com o pH dos hidrogéis, não houve diferença em relação as suspensões pois os polímeros Poloxamer® 407 e HPMC são de natureza não iônica, o pH da formulação H-CLNCc foi inferior ao da formulação H-LNCc.

Na análise reológica realizada avaliou-se a temperatura de transição sol-gel. A formulação H-CLNCc apresentou um aumento não significativo da temperatura de transição, propõem-se que o ácido acético utilizado na solução de revestimento da quitosana tem influência em reduzir as ligações de hidrogênio entre os unímeros do Poloxamer® 407 (Giuliano et al., 2018a). Contudo, não houve diferença significativa entre os três grupos analisados, H-LNCc, H-CLNCc e H-H₂O (hidrogel contendo água na sua constituição, em substituição as suspensões de nanocápsulas), demonstrando que a incorporação das nanocápsulas não alterou a propriedade de termogelificação. A temperatura de geleificação foi de 27,07 °C, 28,66 °C e 27,47 °C, para as formulações H-LNCc, H-CLNCc e H-H₂O, respectivamente, estando na faixa de temperatura para geleificação *in situ*, a qual deve ser superior a 25°C, para evitar problemas com a manufatura, e inferior a 37°C, pois uma temperatura maior a temperatura corporal manteria o poloxâmero em seu estado líquido impedindo-o de atingir sua geleificação (Cho et al., 2011).

O método analítico desenvolvido para quantificação da curcumina foi específico, linear ($r = 0,9986$, $n=3$) na faixa de 10-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; preciso intradia (DPR= 0,92) e interdia (DPR=0,86). Os limites de quantificação e detecção foram calculados e são, respectivamente, 2,94 e 0,88 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O teor de curcumina não foi alterado após o revestimento ($p > 0,05$) e a taxa de associação da formulação CLNCc foi próxima a 100%, comprovando a elevada afinidade que a curcumina apresenta pelo núcleo oleoso e/ou pela parede polimérica, resultado semelhante ao encontrado na literatura (Coradini et al., 2014). Após o desenvolvimento do hidrogel o conteúdo de curcumina em ambas formulações permanecer em torno de 100%, comprovante que a metodologia de produção do

hidrogel a partir das suspensões de nanocápsulas não resultou em degradação da curcumina.

O estudo de liberação *in vitro* visou prever a quantidade de curcumina liberada em função do tempo, empregando-se como meio de liberação tampão saliva padronizado contendo 20% (v/v) de etanol absoluto, para mimetizar as condições de administração da formulação na mucosa bucal e respeitar a condição *sink*. Neste teste realizou-se uma comparação entre as formulações CLNCc e LNCc, para avaliar a possível influência do revestimento de quitosana na liberação da curcumina a partir das nanocápsulas. A quantidade acumulada de curcumina liberada ao final do experimento, 48 horas, para ambas as formulações foi de cerca de 9% (0,0809 mg.mL⁻¹). A liberação controlada de curcumina quando nanoencapsulada também foi observada por Coradini e colaboradores e por Yallapu e colaboradores (Yallapu et al., 2010); contudo estes autores observaram um acumulado em torno de 20% de curcumina liberada no mesmo período de tempo. Essa diferença no percentual de liberação pode ser devida a constituição dos meios empregados para cada estudo, uma vez que o meio utilizado no presente estudo é rico em sais e os meios empregados nos estudos já publicados apresentam menor concentração de sais e a adição de tensoativos, como é o caso do Tween[®] 80.

A sobreposição nos perfis de liberação da curcumina a partir das nanocápsulas revestidas e não revestidas indica que o revestimento não impactou no perfil de liberação, o que pode ser confirmado pelo valor da constante de velocidade de liberação (k) que permaneceu inalterada após o revestimento ($p > 0,05$). O modelo matemático que melhor descreve o perfil de liberação da curcumina a partir das nanocápsulas é de primeira ordem monoexponencial, ou seja, a quantidade de curcumina na formulação influencia a quantidade de substância liberada, e sua liberação ocorre em apenas uma velocidade.

A mucoadesividade, tanto das suspensões quanto dos hidrogéis, foi avaliada por duas diferentes metodologias, a lavabilidade empregando mucosa de bochecha suína como membrana e a análise do trabalho de mucoadesão utilizando discos de mucina como modelo. O teste de lavabilidade avalia a resistência de formulações a permanecer interagindo com uma determinada

superfície frente a um fluxo de meio que é aplicado sobre esta superfície, logo é um dos testes utilizados para avaliação do potencial bioadesivo. Neste estudo foi utilizada como membrana modelo a mucosa de bochecha suína e o meio empregado foi o meio salivar simulado. Os resultados demonstram que a formulação CLNCc apresentou quantidades menores, porém sem diferença estatística, de curcumina no meio lavado em relação à formulação LNCc, ou seja, a CLNCc parece ser mais mucoadesiva, pois permanece mais aderida a mucosa de bochecha suína. Ao se comparar as suspensões LNCc e CLNCc e os respectivos hidrogéis obtidos, H-LNCc e H-CLNCc observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) indicando maior quantidade de curcumina lavada a partir das suspensões em relação aos hidrogéis.

A partir deste resultado, pode-se inferir que o revestimento com quitosana não influenciou de modo significativo na resistência ao fluxo de lavagem, mas sim a incorporação da suspensão no gel, o qual apresentou evidente capacidade mucoadesiva. Ao final do experimento de lavabilidade a quantidade de curcumina permeada através da mucosa foi avaliada. Em relação a quantidade permeada, os hidrogéis apresentaram maior percentual de permeação de curcumina em relação as suspensões. O gel contendo a suspensão revestida com quitosana (H-CLNCc) apresentou a maior concentração de curcumina no meio receptor ($52,45 \pm 8,98 \mu\text{g}$) ($p < 0,05$), em relação a formulação H-LNCc ($18,13 \pm 10,24 \mu\text{g}$). Neste aspecto, é possível que a presença da quitosana tenha facilitado o processo de penetração e permeação através da mucosa bucal suína por abertura transitória das junções intercelulares da mucosa (Al-Kassas et al., 2016).

O teste foi realizado utilizando mucosas bucais de diferentes porcos, logo a espessura e a quantidade de muco da mucosa são distintas. Por isso, houve um desvio relativo elevado na quantidade de curcumina lavada e permeada em todas as formulações testadas.

Como citado anteriormente a mucoadesividade das formulações também foi avaliada determinando-se o trabalho de mucoadesão em texturômetro. O trabalho de mucoadesão é definido como a área sob a curva obtida plotando-se força de descolamento *versus* a distância percorrida entre as duas superfícies que estão em contato até elas descolarem uma da outra. Se empregarmos

discos de mucina como sendo uma das superfícies podemos afirmar que quanto maior é o trabalho de adesão maior é a mucoadesividade da formulação testada (Kraisit et al., 2018), como é observado nos dois hidrogéis H-LNCc e H-CLNCc. Do mesmo modo a distância de descolamento indica maior resistência ao descolamento das amostras de géis em relação às nanocápsulas em suspensão. Tanto os resultados obtidos pela metodologia da lavabilidade quanto os obtidos pela análise em texturômetro comprovam maior influência na mucoadesão do desenvolvimento do hidrogel termoreversível contendo HPMC do que do revestimento de quitosana nas nanocápsulas.

As formulações desenvolvidas tiveram sua segurança avaliada empregando-se o HET-CAM, nesta metodologia ovos de galinha embrionados são utilizados para avaliar o surgimento de fenômenos vasculares após a aplicação das diferentes formulações sobre a membrana corioalantóide destes ovos. Fenômenos como coagulação, hemorragia e vasoconstrição são observados e utilizados para calcular o índice de irritação de formulações, primeiramente este teste foi proposto para avaliar a segurança de formulações aplicadas na mucosa ocular (Katzer et al., 2014; Luepke, 1985), mas atualmente vem sendo empregado para avaliação da segurança de formulação administradas topicamente em outras mucosas, como a mucosa vaginal (Pohlmann et al., 2018). Para validar a avaliação, grupos controle sabidamente irritantes foram utilizados, esses grupos foram solução de hidróxido de sódio e solução de lauril sulfato de sódio, os índices de irritação (IR) classificam estes dois controles como extremamente e moderadamente irritantes, respectivamente.

Quando as suspensões foram avaliadas os índices de irritação foram iguais a zero, os índices de irritação para os hidrogéis H-LNCc ($IR=0,51\pm 0,91$) e H-CLNCc ($IR=0,78\pm 0,97$) os classificam como não irritantes. Mesmo sendo classificados como não irritantes os hidrogéis apresentaram IR diferente de zero. Um hidrogel foi preparado retirando-se as suspensões de nanocápsulas e substituindo por água (H-H₂O) e o IR determinado, a fim de avaliar a influência dos polímeros Poloxamer[®] 407 e HPMC no IR diferente de zero observado nas formulações H-LNCc e H-CLNCc. Para a formulação H-H₂O o IR foi de $0,23 \pm 0,56$, permitindo associar os resultados dos hidrogéis contendo as suspensões

de nanocápsulas a presença dos polímeros empregados para manufatura dos hidrogéis. Mesmo com o IR diferente de zero vale ressaltar que as formulações são classificadas como não irritantes, corroborando com os achados na literatura que formulações contendo Poloxamer[®] 407 são interessantes devido a que elas não apresentem ação irritante quando em contato com membranas biológicas (Giuliano et al., 2018b).

Visto que a formulação foi desenvolvida para aplicação na mucosa bucal, células da linhagem SCC-25, de carcinoma epidermóide bucal, foram utilizadas para avaliar a viabilidade celular após tratamento com curcumina na forma livre (em solução) e nanoencapsulada (LNCc e CLNCc). Após exposição das células a concentração de 5 μM de curcumina nos diferentes tratamentos não observou-se diferença significativa entre todos os grupos avaliados e nos tempos de tratamento empregados (24, 48 e 144 horas). Em contrapartida, quando avaliadas as concentrações de 10 μM e de 20 μM , observou-se uma redução significativa na viabilidade celular a partir de 48 horas de tratamento quando as diferentes formulações foram comparadas ao grupo controle não tratado.

Dos grupos analisados, a curcumina em solução (CUR) apresentou maior potencial em reduzir a viabilidade celular desta linhagem após 48 e 144 horas de tratamento quando comparada as formulações das nanocápsulas, nas concentrações de 10 e 20 μM . Esse resultado pode ser atribuído ao lento perfil de liberação da curcumina a partir das nanocápsulas, já que apenas cerca de 9% é liberado após 48 horas, e que a curcumina quando em solução está a disposição mais imediata ao meio contendo as células. Observou-se, adicionalmente, que o grupo das nanocápsulas sem fármaco (CLNC) também apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular quando estas células foram tratadas com volume de nanocápsulas equivalente às concentrações de 10 μM e 20 μM de curcumina, esse efeito pode ser devido à atividade citotóxica que alguns sistemas nanoparticulados podem apresentar, principalmente devido a algumas propriedades inerentes aos polímeros utilizados na manufatura destas nanopartículas. No caso da quitosana, utilizada para o revestimento das nanocápsulas, estudos apontam para a inibição da proliferação de várias linhagens celulares, mantendo uma toxicidade baixa em células sadias (Sarangapani et al., 2018).

Semelhantemente, Mazzarino e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da citotoxicidade de nanocápsulas revestidas e não revestidas com quitosana por 24, 48 e 72 horas com concentrações de 1 a 100 μM em linhagem SCC-9 de câncer de boca, observaram também menor viabilidade celular no grupo da curcumina livre em relação a forma nanoencapsulada após 72 horas de tratamento, com uma viabilidade de 45% e 90%, respectivamente.

Cabe salientar que estes resultados podem variar de acordo as condições experimentais utilizadas. Adicionalmente, em um meio *in vitro*, não é possível mimetizar totalmente as condições do organismo humano, onde substâncias ativas sofrem processo de distribuição e metabolização, que são ausentes ou diminuídos quando são tratados em condições *in vitro*.

6. CONCLUSÕES

As nanocápsulas revestidas com quitosana contendo curcumina produzidas demonstraram-se de acordo com as características de controle de qualidade esperadas para formulações nanométricas, diâmetro médio de cerca de 200 nm, distribuição homogênea de diâmetro, morfologia esférica, teor e taxa de associação próximos a 100%. O revestimento com quitosana não influenciou no perfil de liberação da curcumina a partir das nanocápsulas.

Após incorporação dos polímeros HPMC e Poloxamer® 407 para a produção dos hidrogéis, as características físico-químicas das nanocápsulas foram mantidas. Os resultados referentes aos hidrogéis produzidos demonstraram sua termorreversão em temperatura abaixo da temperatura corporal e, adicionalmente, os géis apresentaram-se como formulações não irritantes.

No que diz respeito à mucoadesão o revestimento das nanocápsulas com quitosana não apresentou aumento significativo da interação da formulação com a mucosa bucal suína (avaliada por lavabilidade) ou com discos de mucina (avaliada por texturômetro). Em contrapartida a adição de Poloxamer® 407 e HPMC aumentou significativamente a mucoadesão desta formulação tanto na mucosa bucal suína quanto em discos de mucina. Os resultados indicam que a estratégia de revestimento com quitosana permite maior permeação da curcumina através da mucosa de bochecha suína, em comparação com a hidrogel contendo nanocápsulas não revestidas, melhorando a *performance* da formulação.

Apesar da nanoencapsulação não melhorar os efeitos *in vitro* da curcumina nas células SCC-25, os resultados de permeação e mucoadesão indicam a importância de se associar duas diferentes tecnologias (nanoencapsulação e desenvolvimento de hidrogel) para obter uma formulação final com características desejadas para o tratamento de doenças empregando a mucosa bucal como via de administração.

7. REFERÊNCIAS

- Al-Kassas, R., Wen, J., Cheng, A. E. M., Kim, A. M. J., Liu, S. S. M., & Yu, J. (2016). Transdermal delivery of propranolol hydrochloride through chitosan nanoparticles dispersed in mucoadhesive gel. *Carbohydrate polymers*, *153*, 176-186.
- Almeida, H., Amaral, M. H., Lobão, P., & Lobo, J. M. S. (2014). In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug discovery today*, *19*(4), 400-412.
- Álvarez, R., Cortés, L. E. L., Molina, J., Cisneros, J. M., & Pachón, J. (2016). Optimizing the clinical use of vancomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *60*(5), 2601-2609.
- Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*, *12*(3), 413-420.
- Arafa, M. G., El-Kased, R. F., & Elmazar, M. M. (2018). Thermoresponsive gels containing gold nanoparticles as smart antibacterial and wound healing agents. *Scientific reports*, *8*(1), 1-16.
- Barbi, M. D. S., Carvalho, F. C., Kiill, C. P., Da Silva, B., Santagneli, S. H., Ribeiro, S. J. L., & Gremião, M. P. D. (2015). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for zidovudine nasal delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, *15*(1), 865-874.
- Basnet, P., & Skalko-Basnet, N. (2011). Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*, *16*(6), 4567-4598.

- Bender, E. A., Adorne, M. D., Colomé, L. M., Abdalla, D. S., Guterres, S. S., & Pohlmann, A. R. (2012). Hemocompatibility of poly (ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *International journal of pharmaceutics*, 426(1-2), 271-279.
- Borges, A. F., Silva, C., Coelho, J. F., & Simões, S. (2015). Oral films: current status and future perspectives: I—galenical development and quality attributes. *Journal of Controlled Release*, 206, 1-19.
- Brener, S., Jeunon, F. A., Barbosa, A. A., & Grandinetti, H. D. A. M. (2007). Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Bras Cancerol*, 53(1), 63-9.
- Carvalho, F. C., Bruschi, M. L., Evangelista, R. C., & Gremião, M. P. D. (2010). Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(1), 1-17.
- Carvalho, F. C., Chorilli, M., & Gremião, M. P. D. (2014). Plataformas bio (muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos—propriedades, metodologias e aplicações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 24(2), 203-213.
- Cé, R., Marchi, J. G., Bergamo, V. Z., Fuentefria, A. M., Lavayen, V., Guterres, S. S., & Pohlmann, A. R. (2016). Chitosan-coated dapsone-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus ssp.* *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 511, 153-161.
- Chatterjee, B., Amalina, N., Sengupta, P., & Mandal, U. K. (2017). Mucoadhesive

polymers and their mode of action: A recent update. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(05), 195-203.

Cho, H. J., Balakrishnan, P., Park, E. K., Song, K. W., Hong, S. S., Jang, T. Y., ... & Kim, D. D. (2011). Poloxamer/cyclodextrin/chitosan-based thermoreversible gel for intranasal delivery of fexofenadine hydrochloride. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(2), 681-691.

Ci, L., Huang, Z., Liu, Y., Liu, Z., Wei, G., & Lu, W. (2017). Amino-functionalized poloxamer 407 with both mucoadhesive and thermosensitive properties: preparation, characterization and application in a vaginal drug delivery system. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(5), 593-602.

Codevilla, C. F., Barin, J. S., da Silva, C. D. B., da Silva, T. M., & de Menezes, C. R. (2015). Incorporation of curcumin into nanostructured systems: A review. *Ciência e Natura*, 37, 152-163.

Contri, R. V., Katzer, T., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. (2010). Chitosan hydrogel containing capsaicinoids-loaded nanocapsules: an innovative formulation for topical delivery. *Soft Materials*, 8(4), 370-385.

Coradini, K., Lima, F. O., Oliveira, C. M., Chaves, P. S., Athayde, M. L., Carvalho, L. M., & Beck, R. C. R. (2014). Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(1), 178-185.

dos Santos Chaves, P., Ourique, A. F., Frank, L. A., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Beck, R. C. R. (2017). Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 114,

Esposito, E., Ravani, L., Contado, C., Costenaro, A., Drechsler, M., Rossi, D., ... & Cortesi, R. (2013). Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), 411-418.

de Souza Ferreira, S. B., Braga, G., Oliveira, É. L., da Silva, J. B., Rosseto, H. C., de Castro Hoshino, L. V., ... & Bruschi, M. L. (2019). Design of a nanostructured mucoadhesive system containing curcumin for buccal application: from physicochemical to biological aspects. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 10(1), 2304-2328.

Fakhari, A., Corcoran, M., & Schwarz, A. (2017). Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon*, 3(8), e00390.

Ferreira, S. B. D. S., Moco, T. D., Borghi-Pangoni, F. B., Junqueira, M. V., & Bruschi, M. L. (2016). Rheological, mucoadhesive and textural properties of thermoresponsive polymer blends for biomedical applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 55, 164-178.

Frank, L. A., Sandri, G., D'Autilia, F., Contri, R. V., Bonferoni, M. C., Caramella, C., ... & Guterres, S. S. (2014). Chitosan gel containing polymeric nanocapsules: a new formulation for vaginal drug delivery. *International journal of nanomedicine*, 9, 3151.

Giuliano, E., Paolino, D., Fresta, M., & Cosco, D. (2018). Mucosal applications of poloxamer 407-based hydrogels: an overview. *Pharmaceutics*, 10(3), 159.

Hazzah, H. A., Farid, R. M., Nasra, M. M., Zakaria, M., Gawish, Y., El-Massik, M. A., & Abdallah, O. Y. (2016). A new approach for treatment of precancerous lesions with curcumin solid-lipid nanoparticle-loaded gels: in vitro and

clinical evaluation. *Drug delivery*, 23(4), 1409-1419.

Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in food science & technology*, 48, 40-50.

Hu, A., Huang, J. J., Li, R. L., Lu, Z. Y., Duan, J. L., Xu, W. H., ... & Fan, J. P. (2015). Curcumin as therapeutics for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma by activating SIRT1. *Scientific reports*, 5, 13429.

Kang, B. S., Choi, J. S., Lee, S. E., Lee, J. K., Kim, T. H., Jang, W. S., ... & Park, J. S. (2017). Enhancing the in vitro anticancer activity of albendazole incorporated into chitosan-coated PLGA nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 159, 39-47.

Katzer, T., Chaves, P., Bernardi, A., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Beck, R. C. (2014). Castor oil and mineral oil nanoemulsion: development and compatibility with a soft contact lens. *Pharmaceutical development and technology*, 19(2), 232-237.

Kaur, P., Garg, T., Vaidya, B., Prakash, A., Rath, G., & Goyal, A. K. (2015). Brain delivery of intranasal in situ gel of nanoparticulated polymeric carriers containing antidepressant drug: behavioral and biochemical assessment. *Journal of drug targeting*, 23(3), 275-286.

Koetting, M. C., Peters, J. T., Steichen, S. D., & Peppas, N. A. (2015). Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 93, 1-49.

Kouchak, M., Handali, S., & Boroujeni, B. N. (2015). Evaluation of the mechanical properties and drug permeability of chitosan/Eudragit RL composite

film. *Osong public health and research perspectives*, 6(1), 14-19.

Kraisit, P., Limmatvapirat, S., Luangtana-Anan, M., & Sriamornsak, P. (2018). Buccal administration of mucoadhesive blend films saturated with propranolol loaded nanoparticles. *asian journal of pharmaceutical sciences*, 13(1), 34-43.

Laffleur, F. (2014). Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 40(5), 591-598.

Lee, H. M., Patel, V., Shyur, L. F., & Lee, W. L. (2016). Copper supplementation amplifies the anti-tumor effect of curcumin in oral cancer cells. *Phytomedicine*, 23(12), 1535-1544.

Lee, W. H., Loo, C. Y., Young, P. M., Traini, D., Mason, R. S., & Rohanizadeh, R. (2014). Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. *Expert opinion on drug delivery*, 11(8), 1183-1201.

Lin, H. Y., Thomas, J. L., Chen, H. W., Shen, C. M., Yang, W. J., & Lee, M. H. (2012). In vitro suppression of oral squamous cell carcinoma growth by ultrasound-mediated delivery of curcumin microemulsions. *International journal of nanomedicine*, 7, 941.

Luepke, N. P. (1985). Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology*, 23(2), 287-291.

Marques, A. C., Rocha, A. I., Leal, P., Estanqueiro, M., & Lobo, J. M. S. (2017). Development and characterization of mucoadhesive buccal gels containing lipid nanoparticles of ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*, 533(2), 455-462.

- Mazzarino, L., Borsali, R., & Lemos-Senna, E. (2014). Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: A new strategy for buccal curcumin release. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(11), 3764-3771.
- Morales, J. O., & Brayden, D. J. (2017). Buccal delivery of small molecules and biologics: of mucoadhesive polymers, films, and nanoparticles. *Current opinion in pharmacology*, 36, 22-28.
- Mouftah, S., Abdel-Mottaleb, M. M., & Lamprecht, A. (2016). Buccal delivery of low molecular weight heparin by cationic polymethacrylate nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 515(1-2), 565-574.
- Nair, K. L., Thulasidasan, A. K. T., Deepa, G., Anto, R. J., & Kumar, G. V. (2012). Purely aqueous PLGA nanoparticulate formulations of curcumin exhibit enhanced anticancer activity with dependence on the combination of the carrier. *International journal of pharmaceutics*, 425(1-2), 44-52.
- Nasra, M. M. A., Khiri, H. M., Hazzah, H. A., & Abdallah, O. Y. (2017). Formulation, in-vitro characterization and clinical evaluation of curcumin in-situ gel for treatment of periodontitis. *Drug Delivery*, 24(1), 133–142.
- Parhi, R., Suresh, P., & Pattnaik, S. (2015). Transdermal Delivery of Diltiazem Hydrochloride from Poloxamer-HPMC Gel: in vitro, ex vivo, and in vivo Studies. *Drug Delivery Letters*, 5(3), 163-172.
- Pohlmann, A. R., Fonseca, F. N., Paese, K., Detoni, C. B., Coradini, K., Beck, R. C., & Guterres, S. S. (2013). Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 10(5), 623-638.
- Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2014). Curcumin, a

component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnology advances*, 32(6), 1053-1064.

Puri, V., Sharma, A., Maman, P., Rathore, N., & Singh, I. (2019). Overview of Mucoadhesive Biopolymers for Buccal Drug Delivery Systems. *Int J App Pharm*, 11(6), 18-29.

Qin, R., Steel, A., & Fazel, N. (2017). Oral mucosa biology and salivary biomarkers. *Clinics in dermatology*, 35(5), 477-483.

Rençber, S., Karavana, S. Y., Şenyiğit, Z. A., Eraç, B., Limoncu, M. H., & Baloğlu, E. (2017). Mucoadhesive in situ gel formulation for vaginal delivery of clotrimazole: formulation, preparation, and in vitro/in vivo evaluation. *Pharmaceutical development and technology*, 22(4), 551-561.

Salehi, S., & Boddohi, S. (2017). New formulation and approach for mucoadhesive buccal film of rizatriptan benzoate. *Progress in biomaterials*, 6(4), 175-187.

Sarangapani, S., Patil, A., Ngeow, Y. K., Elsa Mohan, R., Asundi, A., & Lang, M. J. (2018). Chitosan nanoparticles' functionality as redox active drugs through cytotoxicity, radical scavenging and cellular behaviour. *Integrative biology*, 10(5), 313-324.

Shen, M., Xu, Y. Y., Sun, Y., Han, B. S., & Duan, Y. R. (2015). Preparation of a thermosensitive gel composed of a mPEG-PLGA-PLL-cRGD nanodrug delivery system for pancreatic tumor therapy. *ACS applied materials & interfaces*, 7(37), 20530-20537.

Singh, I., Pawar, P., Sanusi, E. A., & Odeku, O. A. (2017). Mucoadhesive polymers for drug delivery systems. *Adhesion in Pharmaceutical, Biomedical*

and Dental Fields, 89-113.

Siqueira, N. M., Contri, R. V., Paese, K., Beck, R. C. R., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. (2011). Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. *Skin pharmacology and physiology*, 24(3), 166-174.

Song, Z., Feng, R., Sun, M., Guo, C., Gao, Y., Li, L., & Zhai, G. (2011). Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution in vivo. *Journal of colloid and interface science*, 354(1), 116-123.

Teubl, B. J., Meindl, C., Eitzlmayr, A., Zimmer, A., Fröhlich, E., & Roblegg, E. (2013). In-vitro permeability of neutral polystyrene particles via buccal mucosa. *Small*, 9(3), 457-466.

Tran, P. H., Duan, W., & Tran, T. T. (2019). Recent developments of nanoparticle-delivered dosage forms for buccal delivery. *International journal of pharmaceutics*, 118697.

Weber, J., Funk, N. L., Motta, M. H., Guedes, A. M., Visintainer, A. P. C., Tedesco, S. B., & da Silva, C. D. B. (2016). Association of borage oil and betamethasone dipropionate in lipid-core nanocapsules: characterization, photostability and in vitro irritation test. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 16(2), 1354-1362.

Xiao, C., Wang, L., Zhu, L., Zhang, C., & Zhou, J. (2014). Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma SCC-9 cells proliferation by regulating miR-9 expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 454(4), 576-580.

- Xu, J., Strandman, S., Zhu, J. X. X., Barralet, J., & Cerruti, M. (2015). Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. *Biomaterials*, 37, 395–404
- Yadav, V. R., Prasad, S., Kannappan, R., Ravindran, J., Chaturvedi, M. M., Vaahtera, L., ... & Aggarwal, B. B. (2010). RETRACTED: Cyclodextrin-complexed curcumin exhibits anti-inflammatory and antiproliferative activities superior to those of curcumin through higher cellular uptake.
- Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2010). Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of colloid and interface science*, 351(1), 19-29.
- Zatta, K. C., Frank, L. A., Reolon, L. A., Amaral-Machado, L., Egito, E. S., Gremião, M. P. D., ... & Guterres, S. S. (2018). An inhalable powder formulation based on micro-and nanoparticles containing 5-fluorouracil for the treatment of metastatic melanoma. *Nanomaterials*, 8(2), 75.
- Zhen, L., Fan, D., Yi, X., Cao, X., Chen, D., & Wang, L. (2014). Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion via EGFR signaling pathways. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(10), 6438.
- Zhu, Z., Zhai, Y., Zhang, N., Leng, D., & Ding, P. (2013). The development of polycarbophil as a bioadhesive material in pharmacy. *asian journal of pharmaceutical sciences*, 8(4), 218-227.
- Zlotogorski, A., Dayan, A., Dayan, D., Chaushu, G., Salo, T., & Vered, M. (2013). Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer—I: Curcumin. *Oral oncology*, 49(3), 187-191.

