

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Ciências da Saúde

BRENO NORONHA MATOS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS
MUCOADESIVAS DE OXALIPLATINA PARA A QUIMIOTERAPIA TÓPICA DE
TUMORES DA CAVIDADE ORAL**

BRASÍLIA

2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas mucoadesivas de oxaliplatina para quimioterapia tópica de tumores da cavidade oral

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Aluno: Breno Noronha Matos

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Coorientador: Marcílio Sérgio Soares da Cunha-Filho

Brasília, março de 2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Breno Noronha Matos

Título do trabalho: Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas mucoadesivas de oxaliplatina para quimioterapia tópica de tumores da cavidade oral

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 23/03/2018

Banca examinadora

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Universidade de Brasília

Prof. Dr^a. Dâmaris Silveira
Universidade de Brasília

Profa. Dr^a. Graziella Anselmo Joanitti
Universidade de Brasília – Ceilândia

Profa. Dr^a. Stephania Fleury Taveira
Universidade Federal de Goiás

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Helena Ferreira Noronha e Claudio César Matos por todo apoio e suporte durante esses anos de aprendizado. Principalmente, por entenderem que o principal caminho para a minha realização profissional seria por meio de uma educação de qualidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso por todos os ensinamentos e apoio ao longo desses anos. Por sempre me orientar com educação e paciência, e por ter me ensinado uma importante lição, que todo trabalho sério pode ser realizado de forma responsável e com respeito ao próximo.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares Cunha-Filho, pelo auxílio na realização dos testes analíticos e de análise térmica, e contribuição valorosa para a minha formação acadêmica.

Aos professores da Universidade de Brasília que contribuíram de alguma forma para o meu enriquecimento intelectual, em especial, à Prof. Dr^a. Taís Gratieri.

À Prof. Dr^a. Eliete Neves da Silva Guerra do Departamento de Odontologia da Universidade de Brasília por ter cedido a linhagem celular de câncer de língua humana (células SSC-9).

Ao Prof. Dr. Felipe Araujo e a Msc. Martha Bravo pelo auxílio nos testes de viabilidade celular.

Às alunas de iniciação científica Larissa Maria Araújo e Camila Cardoso pelo auxílio em momentos pontuais da minha pesquisa.

Aos meus amigos de laboratório, em especial, Tâmara Ângelo, Paula Martins, Fernando Pires de Sá, Lorena Malaquias, Maíra Texeira e Ricardo Nunes por todos os debates, conversas e carinho, sem vocês esse período seria bem menos divertido.

Aos meus colegas de laboratório, Wanessa Quintão, Geisa Barbalho, Camila Yumi, Giselly Almeida, Devana, Giullian Nepomuceno, Ludmila Alvim, Felipe Queiroz, em especial, minha amiga e técnica Renata Melo, pela ajuda nos experimentos, tornando o trabalho no laboratório mais prazeroso.

À Mairinha minha amiga e companheira de laboratório, com certeza um exemplo a ser seguido.

À Thaiene Avila Reis, por me incentivar e aconselhar durante todo os trabalhos em conjunto.

Ao Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília pelo auxílio na obtenção das fotomicrografias eletrônicas de varredura.

À Universidade de Brasília, em especial ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), por permitir essa importante oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas concessões de apoio financeiro ao projeto e bolsa de Doutorado no país, respectivamente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura molecular da oxaliplatina (OXPT, A) e da quitosana (B).....	2
Figura 1.2. Estágios de proliferação das células cancerígenas.....	4
Figura 1.3. Corte sagital do trato aerodigestivo superior	5
Figura 1.4. Região anatômica da cavidade oral.	6
Figura 1.5. Representação esquemática da formação do complexo de platina no DNA <i>in vivo</i>	8
Figura 1.6. Rota de biotransformação da oxaliplatina.	9
Figura 1.7. Representação esquemática das nanopartículas poliméricas. A) Nanocápsulas e B) Nanoesferas.....	12
Figura 1.8. Histologia da mucosa oral humana saudável. A) Epitélio Oral, B) Lâmina própria, C) Muco-periostico.....	13
Figura 1.9. Iontoforese utilizando um sistema de eletrodos de Ag/AgCl. O ânodo contém um fármaco ionizável D ⁺ e seu contra-íon A ⁻ e Na ⁺ Cl ⁻ . Adaptado da referência.....	16
Figura 1.10. A) Eletrorrepulsão: O eletrodo positivo repele fármacos de carga positiva, fazendo com que atravessem a mucosa. No eletrodo negativo, fármacos de cargas negativas são repelidos. B) Eletrosmose: O fluxo de um solvente fisiológico promovido pela corrente elétrica entre os eletrodos positivo e negativo permite a transferência de fármacos neutros..	17
Figura 2.1. Sobreposição dos cromatogramas por CLAE das soluções aquosas de OXPt analisadas em diferentes concentrações (0,5; 3,0 e 15,0 µg.mL ⁻¹).	30
Figura 2.2. Sobreposição dos cromatogramas por CLAE de uma solução simples de OXPt (5,0 µg.mL ⁻¹) e soluções de oxaliplatina contaminadas com 5,0 µg.mL ⁻¹ de (a) quitosana ou (b) poloxamer.....	31
Figura 2.3. Seletividade do método de quantificação de OXPt (5,0 µg.mL ⁻¹) sozinha, com quitosana (5,0 µg.mL ⁻¹) e com poloxamer (5,0 µg.ml ⁻¹), analisados em termos de diferenças entre (a) as áreas dos picos e (b) os tempos de retenção. * p < 0,05.	31

Figura 2.4. Representação gráfica da curva analítica obtida para a OXPt por CLAE ($y = 7159,7x - 140,9$; $r = 0,9998$; $n = 3$).	32
Figura 3.1. Caracterização molecular da OXPt não tratada e após exposição à luz e temperatura. As áreas pontilhadas indicam os principais grupos funcionais da molécula de OXPt obtida através de FTIR.	41
Figura 3.2. Caracterização térmica (TGA e DSC) da OXPt não tratada e após exposição à luz e temperatura.	42
Figura 3.3. Caracterização cristalográfica e morfológica da OXPt não tratada e após exposição à luz e temperatura.....	43
Figura 3.4. Resultados termogravimétricos da OXPt, polímeros (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) e suas misturas binárias. ΔW = perda de massa da amostra....	45
Figura 3.5. Resultados de FTIR da OXPt, polímeros (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) e suas misturas binárias. As áreas pontilhadas indicam os principais grupos funcionais da molécula de OXPt e as áreas cinza indicam as regiões do espectro com alterações significativas.....	47
Figura 3.6. Resultados de XRPD da OXPt, polímeros (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) e suas misturas binárias. Em destaque, o aumento da linha de base referente as análises do polímero QMPM.	48
Figura 3.7. Microscopia ótica das misturas binárias entre OXPt e polímeros (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) com amostras sem tratamento e após a exposição à luz e temperatura.	49
Figura 4.1. Processo de retirada da mucosa oral da bochecha de suínos. A) Mucosa oral de suíno obtida logo após o abate, B) Mucosa oral limpa e separada da bochecha (Lado superior) e C) Parte interna da mucosa oral suína	57
Figura 4.2. Representação do protocolo de eficiência de encapsulação por Vivaspin).....	60
Figura 4.3. Protocolo da permeação dinâmica (A) Mucosa oral de suínos tratadas com solução de mucina a 1% p/v, (B) Pedacos de mucosa mantidos por 10 minutos após tratamento com mucina, (C) Adição das formulações de interesse e (D) Mucosa oral de suínos colocadas em posição vertical no suporte.....	65

Figura 4.4 Preparo do eletrodo negativo de cloreto de prata (AgCl) (Cátodo). 1) Fio de prata com a alça moldada na ponta. 2) Imersão da alça em AgCl fundido. 3) Formação do eletrodo de cloreto de prata.	66
Figura 4.5. Preparo do eletrodo positivo prata (Ag) (Ânodo). Processo de redução do eletrodo de cloreto de prata para a obtenção do eletrodo de Ag.....	66
Figura 4.6. Representação esquemática da permeação com iontoforese: (A) Permeacao com circuito fechado e (B) Posicionamento dos eletrodos nas células de Franz.....	67
Figura 4.7. Relação entre concentração de TPP ($\mu\text{g}/\text{mL}$) e a concentração de quitosana ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) com o diâmetro hidrodinâmico (nm) das partículas com o valor de pH fixado em 4,5. ($p < 0,0001$).....	70
Figura 4.8. Relação entre concentração de TPP ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e o pH com o PDI das partículas com o valor da solução de quitosana fixada em $1,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ($p < 0,0001$).	71
Figura 4.9. Relação entre concentração de TPP ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e a concentração de quitosana ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) com o potencial zeta das partículas com o valor de pH fixado em 4,5 ($p < 0,0001$).....	72
Figura 4.10. Relação entre concentração de quitosana ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e o pH com o potencial zeta das partículas com o valor da solução de TPP fixado em $1,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ($p < 0,0001$).....	73
Figura 4.11. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (Quanta FEG 250 FEI, USA) em aumento: de A)10.000 X, B) 10.000 X, C) 30.000 E D) 40.0000 X para as NP-QS (A e C) e NP-OXPt (B e D).....	75
Figura 4.12. Diâmetro hidrodinâmico da dispersão de nanopartículas (nm) em função do tempo (dias) referente às replicatas armazenadas a temperatura de 10°C e 25°C	76
Figura 4.13. PDI da dispersão de nanopartículas (nm) em função do tempo (dias) referente às replicatas armazenadas a temperatura de 10°C e 25°C	76
Figura 4.14. Potencial zeta (mV) da dispersão de nanopartículas em função do tempo referente às replicatas armazenadas a temperatura de 10°C e 25°C	77

Figura 4.15. Teor da dispersão de nanopartículas em função do tempo referente às replicatas armazenadas a temperatura de 10°C e 25°C.....	77
Figura 4.16. Perfis de liberação da OPXt a partir da formulação NP-OXPt contendo 1,5 µg/mL do fármaco, pH 5,5 em comparação a uma solução aquosa do fármaco contendo a mesma concentração de OXPt e mesmo pH.....	78
Figura 4.17. Distribuição de tamanho hidrodinâmico referente às amostras de NP-OXPt, MCN e NP-OXPt + MCN obtidos através do equipamento Zetasizer Nano Series.	80
Figura 4.18. Quantidade de OXPt (µg.cm ²) retida na mucosa após a) 1h e b) 2 h de tratamento com as NP-OXPt em comparação ao controle (solução aquosa de OXPt) seguindo-se os protocolos estático e dinâmico (n=4).....	82
Figura 4.19. OXPt recuperado da mucosa suína após 2 h de tratamento passivo e iontoforético com uma solução aquosa de OXPt (1,5mg.mL ⁻¹ , pH 5,5) e com nanopartículas de quitosana carregadas com OXPt (1,5mg.mL ⁻¹ , pH 5,5) (n=4)....	83
Figura 4.20. Quantidade de células viáveis (%) após o tratamento com: i) solução aquosa de OXPt, ii) NP-QS e iii) NP-OXPt, sendo a concentração final de OXPt respectivamente: a) 1.5 µg.mL ⁻¹ b) 2.5 µg.mL ⁻¹ c) 5.0 µg.mL ⁻¹ d) 10 µg.mL ⁻¹ e) 25 µg.mL ⁻¹ f) 50 µg.mL ⁻¹ . *p<0,05, *p<0,005, p<0,002.	88
Figura 4.21. Porcentagem de células viáveis e apoptóticas após o tratamento com: i) solução aquosa de OXPt, ii) NP-QS e iii) NP-OXPt, sendo a concentração final de OXPt respectivamente: a) 5.0 µg.mL ⁻¹ b)10 µg.mL ⁻¹ c) 25 µg.mL ⁻¹ . *p<0,05, *p<0,005.....	85
Figura 4.22. Porcentagem de células viáveis e apoptóticas após o tratamento com: i) solução aquosa de OXPt, ii) NP-QS e iii) NP-OXPt, sendo a concentração final de OXPt respectivamente: a) 5.0 µg.mL ⁻¹ b)10 µg.mL ⁻¹ c) 25 µg.mL ⁻¹ . *p<0,05, *p<0,005.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Variação das condições do método analítico. Amostras de OXPt (15,0 µg.ml ⁻¹) foram analisadas por CLAE usando uma coluna C ₁₈ , com detecção de UV fixado em 255 nm, a 25°C.....	29
Tabela 2.2. Precisão (CV) e exatidão do método por CLAE para a quantificação de OXPt.....	33
Tabela 3.1. Resumo das evidências de (in)compatibilidade entre OXPt e os polímeros selecionados (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) após ensaios de DSC, TGA, FTIR, Microscopia ótica e XRPD.	51
Tabela 4.1. Desenho experimental para obtenção de nanopartículas de quitosana (NP).....	58
Tabela 4.2. Quantidade de fármaco (OXPt) e polímero (quitosana) por 7 mL de solução utilizados na obtenção das nanopartículas.	59
Tabela 4.3. Eficiência de encapsulação obtida com diferentes proporções de polímero/fármaco durante o preparo das nanopartículas de OXPt a partir do método indireto.....	74
Tabela 4.4. Comparação do tamanho (nm), potencial zeta (mV) e PDI das NP-QS com as NP-OXPt na proporção (1:1) (m/m) fármaco/polímero.....	74
Tabela 4.5. Valores de recuperação em % de OXPt a partir de mucosa oral suína.	81

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABDI	Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV%	Coeficiente de Variação
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> (Calorimetria diferencial de varredura)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTG	<i>Derivative thermogravimetry</i> (Termogravimetria derivada)
EE%	Eficiência de encapsulação
FDA	Food and Drugs Administration
FS	Fosfatidilserina
hCG	Proteína Gonadotrofina Coriônica Humana
HPV	Papiloma Vírus Humano
ICH	International Conference of Harmonization
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Espectrometria de Massas
NP	Nanopartículas de Quitosana
NP-OXPt	Nanopartículas de Quitosana contendo Oxaliplatina
OXPt	Oxaliplatina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

IPD	Índice de Polidispersão
PEG	Poli(etileno)glicol
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
POLOX	Poloxamer
QBPM	Quitossana de Baixo Peso Molecular
QMPM	Quitossana de Médio Peso Molecular
RNA	Ácido Ribonucleico
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SDR	Síndrome do Desconforto Respiratório
SFB	Soro Fetal Bovino
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
TPP	Tripolifosfato de Sódio
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta
XRPD	Difração de pó de Raio X

RESUMO

MATOS, B. N. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas mucoadesivas contendo oxaliplatina para quimioterapia tópica de tumores da cavidade oral. 2018 Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

O principal objetivo desse estudo foi desenvolver e caracterizar nanopartículas mucoadesivas de quitosana encapsulando o fármaco oxaliplatina (OXPt) como estratégia para o tratamento tópico de cânceres da cavidade oral. O método analítico validado para as análises quantitativas demonstrou a separação da OXPt sem a interferência dos solventes ou dos polímeros mais relevantes para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas bioadesivas (quitosana e poloxamer). O método apresentou linearidade ($r > 0,999$) durante o estudo da OXPt em um faixa de concentração de ($0,5 - 15,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com valores de precisão e exatidão aceitáveis ($< 5,0\%$). Os limites de detecção e quantificação foram $0,0999$ e $0,331 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Após os estudos de compatibilidade físico-químico e análise térmica, a OXPt pode ser classificada como fármaco de Classe III de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), isto é, a molécula apresenta alta solubilidade em água e baixa permeabilidade. OXPt no estado sólido mostrou ser adequada para as condições de produção farmacêutica, sendo estável quando exposta a aquecimento ou luz. Dentre os polímeros testados, somente a quitosana de médio peso molecular mostrou-se incompatível com OXPt, com forte evidência de decomposição química e mudanças físicas nas amostras de fármaco-polímero. As partículas desenvolvidas, nesse estudo, apresentaram características de composição, tamanho ($188,43 \pm 19,7$) e potencial zeta ($+44,81 \pm 2,8$) que as conferiram mucoadesividade, mesmo quando o tratamento *ex vivo* foi realizado com sucessivas "lavagens" da formulação para simular o fluxo salivar. O fármaco tanto em sua forma encapsulada como livre foi capaz de inibir o crescimento da linhagem SSC-9 do câncer de língua em concentrações acima de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o principal mecanismo de morte celular ocasionado parece ser o de apoptose. Dessa forma, a formulação desenvolvida parece ser uma alternativa promissora como método adjuvante no tratamento dos cânceres da cavidade oral.

Palavras-Chave: Mucoadesão; Quitosana; Nanopartícula; Câncer Oral e Oxaliplatina.

ABSTRACT

MATOS, B. N. Development and characterization of mucoadhesive nanoparticles containing oxaliplatin for topical chemotherapy of tumors of the oral cavity. 2018 Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

This study aimed to develop and characterize mucoadhesive chitosan nanoparticles encapsulating oxaliplatin (OXPt) as a strategy for the topical treatment of buccal cancers. Validated method demonstrated OXPt separation without interference from the solvents or polymers with the most relevance for developing of bioadhesive pharmaceutical drug carriers (chitosan and poloxamer). Method was linear ($r > 0.999$) over studied OXPt concentration range (0.5-15.0 $\mu\text{g/mL}$) with acceptable precision and accuracy. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.099 and 0.331 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. OXPt could be classified as a class III drug according to BCS, i.e., is highly water-soluble but few permeable. OXPt in solid state showed to be adequate to pharmaceutical manufacturing conditions, being stable even when exposed to heating and light. Among the tested polymers, only chitosan of medium molecular weight is incompatible with OXPt, with strong evidence of chemical decomposition and physical changes in drug-polymer samples. The particles developed in this study showed characteristics of composition, size ($188,43 \pm 19,7$) and zeta potential ($+44,81 \pm 2,8$) that conferred mucoadhesiveness even when the *ex vivo* treatment was performed with successive "washes" of the formulation to simulate the salivary flow. The drug both encapsulated and in your free form was able to inhibit the growth of the SSC-9 line of tongue cancer at concentrations above $\sim 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and the main mechanism of cell death appears to be that of apoptosis. Thus, the developed formulation seems to be a promising alternative as an adjuvant method in the treatment of oral cavity cancers

Key words: Mucoadhesivity; Chitosan; Oral Cancer; Nanoparticles and Oxaliplatin.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Abreviaturas e siglas.....	v
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 O Câncer	2
1.2.1 Carcinogênese.....	3
1.3 Câncer de Cabeça e Pescoço.....	4
1.3.1 Câncer da cavidade oral	5
1.3.2 Tratamento para o câncer oral	6
1.3.3 Oxaliplatina.....	8
1.4 Nanotecnologia aplicada a medicamentos.....	9
1.4.1 Nanopartículas poliméricas.....	11
1.5 Mucosa oral e Mucoadesão.....	13
1.6 Iontoforese.....	15
1.5 Referências	19
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO SIMPLES E SELETIVO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE OXALIPLATINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	26
2.1 Material e Métodos	26
2.1.1 Material	26
2.1.2 Preparo da solução estoque	26
2.1.3 Desenvolvimento do método.....	26
2.1.4 Condições cromatográficas.....	27

2.1.5 Validação do Método.....	27
2.2 Resultados e Discussão	29
2.2.1 Desenvolvimento do Método Cromatográfico	29
2.2.2 Especificidade	30
2.3.3 Linearidade	32
2.3.4 Precisão e exatidão.....	33
2.4 Conclusão	34
2.5 Referências	34
CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA OXALIPLATINA E COMPATIBILIDADE COM OS POLÍMEROS DE MAIOR RELEVÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADOS	37
3.1 Material e Métodos	37
3.1.1 Material	37
3.1.2 Determinação da solubilidade da OXPt	37
3.1.3 Determinação do coeficiente de partição octanol/água (Ko/w)	38
3.1.4 Preparo das amostras.....	38
3.1.5 Caracterização térmica	39
3.1.6 Caracterização molecular.....	39
3.1.7 Caracterização cristalográfica.....	39
3.1.8 Análises morfológicas	40
3.2 Resultados e Discussão	40
3.2.1 Classificação biofarmacêutica da OXPt	40
3.2.2 Perfil físico-químico da OXPt	41
3.2.3 Ensaios de compatibilidade.....	44
3.3 Conclusão.....	51
3.4 Referências	51

CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO OXALIPLATINA PARA TRATAMENTO TÓPICO DE CÂNCER DA CAVIDADE ORAL.....	56
4.1 Material e Métodos.....	56
4.1.1 Material	56
4.1.2. Obtenção da mucosa oral suína	57
4.1.3 Desenho experimental para otimização no preparo das nanopartículas..	57
4.1.4 Caracterização das nanopartículas.....	59
4.1.5 Estabilidade físico-química das NP-OXPt.....	61
4.1.6 Estudos in vitro de liberação da OXPt a partir das NP-OXPt.....	61
4.1.7 Avaliação in vitro da mucoadesividade das NP-OXPt.....	62
4.1.8 Estudo de permeação ex vivo de OXPt através da mucosa oral de suínos a partir das formulações.....	63
4.1.9 Estudo de permeação iontoforética in vitro através da mucosa oral de suínos	65
4.2.10 Ensaio de viabilidade celular.....	67
4.2 Resultados e Discussão	69
4.2.1 Otimização na obtenção e caracterização das nanopartículas	69
4.2.2 Estabilidade NP-OXPt.....	75
4.2.3 Estudos in vitro de liberação da OXPt a partir das NP-OXPt.....	77
4.2.4. Avaliação in vitro do potencial mucoadesivo das NP-OXPt.....	79
4.2.5 Estudo de permeação ex vivo através da mucosa de suínos	81
4.2.7 Ensaio in vitro de viabilidade celular	85
4.3 Conclusão	88
4.4 Referências	89
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	98
ANEXO 1.....	99

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

Carcinomas de cabeça e pescoço, incluindo os cânceres originários da cavidade oral, orofaringe, rinofaringe e laringe, representam um dos tipos mais frequentes de câncer em todo o mundo¹. O carcinoma epidermóide (CECP) é o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço, representando pelo menos 5% dos cânceres diagnosticados em adultos nos Estados Unidos e 8% em todo o mundo². Aproximadamente 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 15% na faringe, 25% na laringe e 20% nas glândulas salivares e tireoide³. A incidência dos cânceres orais é maior em homens do que em mulheres, com idade acima de 40 anos, sendo os principais fatores de risco o consumo de tabaco, de bebidas alcoólicas e a má higiene oral. O câncer oral atinge tanto lábios quanto a mucosa oral em si, que inclui gengivas, palato duro, língua e assoalho da boca^{3,4}.

Devido às dificuldades de procedimentos cirúrgicos, e às características anatômicas da região oral, a cirurgia pode resultar em danos à aparência, disfunções da fala, salivação e respiração⁵. Geralmente, os cânceres da cavidade oral são tratados rotineiramente utilizando radioterapia. No entanto, os resultados da radioterapia isolada têm sido insatisfatórios, especialmente para cânceres em estágio avançado. Assim, a quimioterapia sistêmica tem sido cada vez mais incorporada a protocolos de tratamento³, apesar das altas taxas de eventos adversos induzidos por essa modalidade terapêutica, como por exemplo, perda de cabelos, náuseas, enjoo, vômito ou complicações mais severas, como danos hepáticos, neuropatia periférica, complicações hematológicas, danos renais, entre outros, representarem um fator limitante para o sucesso global do tratamento.

Nesse cenário, um sistema tópico capaz de liberar o agente quimioterápico próximo ao tumor seria uma alternativa não-invasiva e mais segura para administração desses fármacos quando comparada à via intravenosa, melhorando a eficácia, reduzindo os custos do tratamento e o risco de eventos adversos importantes. O desafio nessa terapia tópica é fornecer níveis terapêuticos significativos do quimioterápico para o tecido afetado durante um certo período de tempo.

Este trabalho propôs a nanoencapsulação de um agente quimioterápico utilizando um polímero catiônico, que deve conferir mucoadesividade ao sistema. A hipótese testada foi de que a formulação otimizada contendo as nanopartículas de quitosana com o agente quimioterápico permaneceria próxima ao tumor após aplicação tópica, promovendo um acúmulo do fármaco citotóxico para o tecido doente em concentrações efetivas. O agente quimioterápico selecionado para o desenvolvimento desse estudo foi a oxaliplatina (OXPt, Figura 1.1A), um composto de platina de terceira geração que tem apresentado bons resultados clínicos para o tratamento dos cânceres de cabeça e pescoço⁶. O polímero utilizado no preparo das nanopartículas foi a quitosana (Figura 1.1B), que possui carga positiva, o que deve conferir propriedades bioadesivas às partículas, além de boa biocompatibilidade e não imunogenicidade^{7,8,9}. Estudos também têm demonstrado que a quitosana possui propriedades anti-tumorais¹⁰, podendo agir de maneira sinérgica ao fármaco no combate do tumor oral.

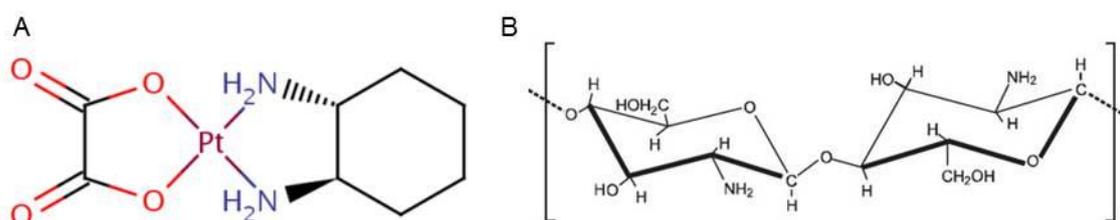


Figura 1.1. Estrutura molecular da oxaliplatina (OXPt, A) (pKa 6,1; PM: 397,29 Da; logP: -0,47; solubilidade em água: 27,5 mg.mL⁻¹) e da quitosana (pKa: 6.3) (B).

1.2 O Câncer

Câncer é um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo sofrer metástase para outras regiões do corpo. O acúmulo dessas células, agressivas e incontroláveis, que se dividem rapidamente é denominado de neoplasia maligna¹¹.

Os diferentes tipos de câncer estão relacionados aos vários tipos de estruturas celulares existentes. Por exemplo, se o câncer se iniciar em tecidos epiteliais, como pele e mucosas, ele é denominado carcinoma. Se o câncer se iniciar em tecidos conjuntivos como o osso, cartilagem ou músculo, é chamado de sarcoma¹¹.

As causas do câncer podem ser externas (meio-ambiente e hábitos ou costumes próprios) e/ou internas (geneticamente pré-determinadas). Entre os casos de câncer, cerca de 80% deles estão associados a fatores externos, em que se pode citar:

- Tabagismo;
- Consumo de bebidas alcoólicas;
- Hábitos alimentares;
- Medicamentos;
- Fatores Ocupacionais;
- Radiação solar, entre outros.

São raros os casos de cânceres que se devam exclusivamente a fatores genéticos, familiares e étnicos, apesar do fator genético exercer um importante papel na oncogênese^{11,12}.

1.2.1 Carcinogênese

O processo de formação do tumor é lento, podendo levar anos para que uma célula cancerosa se prolifere e forme um tumor. Células normais podem sofrer mutação genética, recebendo sinalizações incorretas para suas atividades. Essas alterações ocorrem em protooncogenes, que são inativos em células normais. Porém, quando ativados transformam-se em oncogenes, levando a malignização/cancerização das células¹¹. Essas se proliferam de maneira descontrolada, mais rapidamente que as células normais, invadindo o tecido a sua volta e formando vasos sanguíneos que nutrem esse crescimento descontrolado. Quando atingem a circulação sistêmica ou vasos linfáticos podem chegar a órgão distantes de onde o tumor se formou, originando o que se chama de metástase^{11,12}.

Os estágios de proliferação são:

- Estágio de Iniciação;
- Estágio de Promoção;
- Estágio de Progressão.

Durante o estágio de iniciação as células sofrem ação de agentes cancerígenos provocando alterações genéticas, porém sem a formação de um

tumor. No próximo estágio da carcinogênese, durante a promoção, essas células iniciadas sofrem a ação de agentes cancerígenos chamados de oncopromotores, tornando-se malignas. No estágio de progressão há uma multiplicação descontrolada dessas células, levando ao aparecimento dos primeiros sintomas clínicos da doença, como está esquematizado na Figura 1.2¹¹.

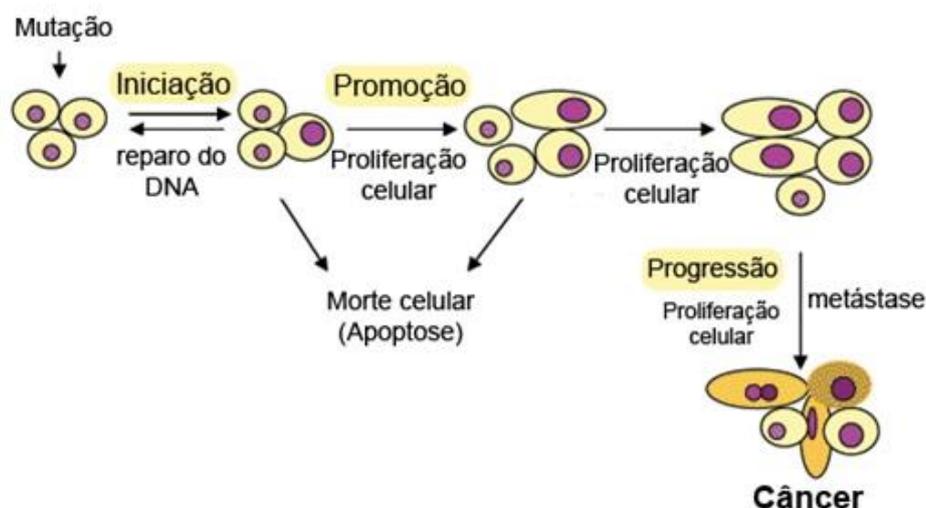


Figura 1.2. Estágios de proliferação das células cancerígenas¹¹

1.3 Câncer de Cabeça e Pescoço

Os cânceres de cabeça e pescoço é a quinta neoplasia mais frequente, com uma incidência de 780.000 casos novos anuais no mundo^{12,13}. O principal tipo histológico, responsável por mais de 90% dos casos, é o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

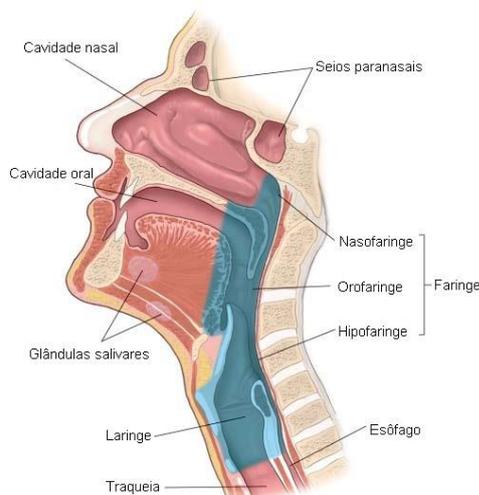


Figura 1.3. Corte sagital do trato aerodigestivo superior⁶¹.

O câncer de cabeça e pescoço acomete principalmente a região da orofaringe, nasofaringe, hipofaringe, cavidade oral e laringe (Figura 1.3). A interação de fatores externos e hereditários estão relacionados no desenvolvimento desse tipo de câncer, principalmente o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas^{12,13}. O papiloma vírus humano (HPV) também está relacionado como um fator de risco alto (25%) no surgimento de câncer de cabeça e pescoço, principalmente de laringe^{11,14}.

1.3.1 Câncer da cavidade oral

Câncer da cavidade oral é o câncer que afeta lábios e o interior da cavidade oral, como gengiva, bochechas (mucosa jugal), palato duro, língua e assoalho da boca (Figura 1.4). A estimativa para 2016 no Brasil foi de 15.490 casos novos, sendo 11.140 casos em homens e 4.350 casos em mulheres. Esse tipo de câncer acomete mais homens com idade superior a 40 anos^{11,18}.

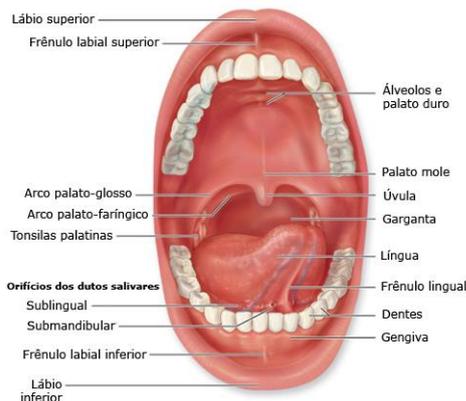


Figura 1.4. Região anatômica da cavidade oral⁶¹.

Os principais fatores de risco para este tipo de câncer são:

- Tabagismo;
- Etilismo;
- Vírus HPV;
- Radiação solar;
- Higiene bucal deficiente;
- Dieta pobre em proteínas e vitaminas e rica em gorduras.

Os principais sintomas são lesões na cavidade oral, manchas vermelhas ou embranquecidas na língua, palato duro, assoalho da boca e mucosa jugal, presença de nódulos no pescoço e rouquidão. Em casos mais avançados é observada uma dificuldade de deglutição e fala, além de uma sensação de que há algo “preso” na garganta^{11,18}.

1.3.2 Tratamento para o câncer oral

O tratamento para o câncer oral, se diagnosticado no início e tratado da forma correta, pode ter uma taxa de cura de até 80%. A primeira linha de tratamento é a cirurgia, seguida de radioterapia. Os dois métodos podem ser utilizados de forma isolada e ambas as técnicas apresentam bons resultados, mas a indicação de cada uma vai depender do tamanho e posicionamento do tumor¹¹.

Devido às características anatômicas da região oral, o tratamento cirúrgico para o câncer nessa região pode resultar em danos à aparência, disfunções da fala,

salivação e respiração, com consequentes impactos sobre a qualidade de vida dos pacientes^{13,15}.

Atualmente, há novas técnicas cirúrgicas, como a cirurgia robótica, que reduzem a taxa de traqueostomia e permitem a recuperação mais rápida da função de deglutição oral e internações mais curtas¹⁶. As opções cirúrgicas com preservação das estruturas anatômicas da região oral, contudo, ainda apresentam limitações e exigem maiores estudos.

A quimioterapia, seja de indução ou concomitante à radioterapia, é rotineiramente integrada ao tratamento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço localmente avançado. O tratamento sequencial incorporando quimioterapia e radioterapia é uma abordagem viável e oferece o potencial de melhorar os desfechos de sobrevida. Contudo, altas doses de quimioterapia ou radioterapia podem levar a muitos efeitos adversos prejudiciais à qualidade de vida do paciente^{13,17}.

Pacientes com a doença avançada em tratamento com quimioterapia neoadjuvante mostraram alta taxa de cura, fator importante na tomada de decisão do tratamento em protocolos futuros que visam um menor índice de toxicidade¹³. O protocolo clínico mais adequado para o tratamento do carcinoma oral em estágio avançado é através de uma terapia multimodal, ou seja, é indicada a cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia¹⁰.

Entre os fármacos normalmente utilizados na quimioterapia de carcinoma oral estão: cisplatina, 5-fluoruracila, cetuximabe e taxanos (paclitaxel e docetaxel)²⁰.

Os compostos de platina são amplamente utilizados em diversos protocolos clínicos para o tratamento de cânceres sólidos, incluindo os de cabeça e pescoço²¹. A cisplatina é um medicamento antineoplásico que atua inibindo a síntese do ADN. Além disso, em menor extensão, ela inibe a síntese de proteínas e ácido ribonucleico (ARN)²¹. Contudo, como a maioria dos quimioterápicos, ela possui vários efeitos tóxicos importantes, como a toxicidade renal, toxicidade gastrointestinal, ototoxicidade e a neurotoxicidade²².

Dessa forma, a OXPt (Figura 1.1. A) mostra-se como um composto de platina alternativo à cisplatina nos tratamentos convencionais de cânceres de cabeça e pescoço, por apresentar bons resultados clínicos e menores efeitos adversos²³. A

cinética de ligação da OXPt com o ADN é rápida e leva no máximo 15 minutos, enquanto com a cisplatina essa ligação ocorre de forma tardia, após 4 a 8 horas. Além disso, OXPt é eficaz sobre certas linhas de tumores resistentes à cisplatina. Apesar de também apresentar importantes efeitos tóxicos, a terapia baseada em OXPt apresenta um menor risco de neutropenia, anemia, náusea, alopecia, tromboembolismo, estomatite e aumento de creatinina quando comparada à terapia com cisplatina²⁴.

1.3.3 Oxaliplatina

Os compostos de platina interagem com o ADN ocasionando uma lesão em nível molecular. As principais interações ocorrem em centros nucleofílicos na posição N7 das purinas do ADN (Figura 1.5). Os adutos formados levam a uma distorção na estrutura da hélice e essa lesão ao ADN conduz à apoptose da célula²⁵.

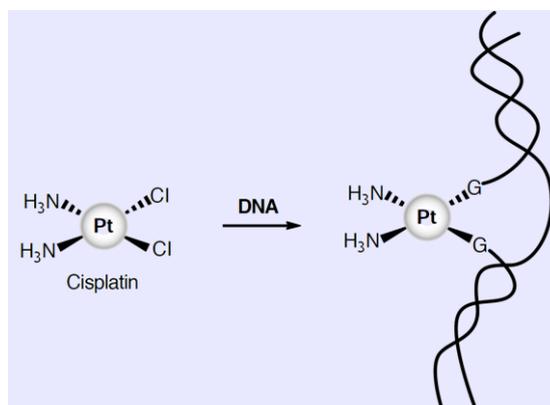


Figura 1.5. Representação esquemática da formação do complexo de platina no DNA *in vivo*⁵⁰.

A OXPt (Figura 1.1 A) pertence à 3ª geração dos compostos de platina, em que o átomo central de platina é envolvido por um oxalato e um 1,2-diaminociclohexano em posição *trans*. Assim como outros derivados da platina, a OXPt exerce seu efeito citotóxico provocando dano ao ADN, inibindo a síntese e formação de novas moléculas nucleicas; conseqüentemente, a síntese do RNA e das proteínas celulares também são inibidas^{25,26}. Dentro da célula, várias espécies reativas são formadas, incluindo a monoaquodACH (1,2-diaminociclohexano)

platina $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{DACH})]^+$ e diaquoDACH platina $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{DACH})]^{2+}$, que se ligam à macromoléculas, como o DNA, levando a célula à apoptose (Figura 1.6).

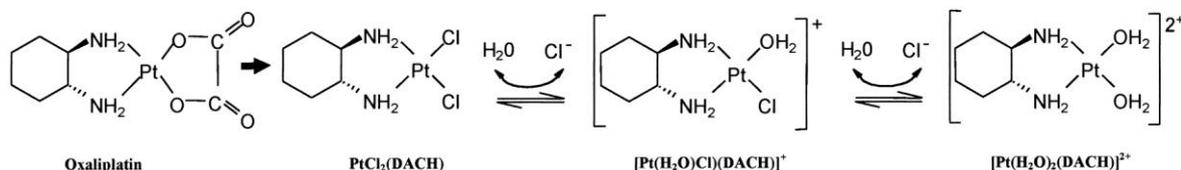


Figura 1.6. Rota de biotransformação da oxaliplatina ⁵¹.

Contudo, a seletividade tumoral dos fármacos de platina é bastante baixa, tornando a toxicidade sistêmica e a resistência ao fármaco os maiores problemas desses complexos²⁵. Por esse motivo, é interessante que se desenvolvam novas tecnologias que permitam diminuir a toxicidade do medicamento, sem contudo afetar a sua atividade antineoplásica, como é o caso de formulações nanoestruturadas mucoadesivas para aplicação tópica do fármaco, que é alvo de estudo deste trabalho.

A OXPt, por ser uma substância hidrofílica e de baixa massa molecular (397,28 Da), deve apresentar fácil incorporação em sistemas poliméricos. Não é encontrado na literatura, no entanto, dados que evidenciem o perfil de permeação desse fármaco através de tecidos quando aplicadas topicamente, nem a concentração efetiva do fármaco em tumores de cavidade oral.

1.4 Nanotecnologia aplicada a medicamentos

Nas terapias medicamentosas sistêmicas convencionais, principalmente as que fazem uso das vias de administração oral e parenteral, são requeridas altas doses do fármaco para que, após a absorção e biodistribuição, a substância ativa atinja o tecido-alvo em concentrações terapêuticas. Nesse processo, quantidades significativas do fármaco são acumuladas em tecidos não alvos, desencadeando diversos efeitos adversos, muitos deles tóxicos^{27,28}. A utilização de vias tópicas, em que o medicamento é aplicado diretamente no tecido-alvo, como pele e mucosas, nem sempre representa uma alternativa viável, uma vez que a absorção de fármacos nesses tecidos tende a ser limitada ou incompleta.

Um grande desafio para os pesquisadores na área farmacêutica está no desenvolvimento de medicamentos mais eficientes, que utilizem doses menores do fármaco e que sejam capazes de direcioná-lo exclusivamente ao local de ação pretendido, sem se acumular em outros tecidos, evitando-se efeitos adversos. Outro importante desafio consiste na liberação progressiva do fármaco durante períodos estendidos, de forma que se reduza a necessidade de aplicação do medicamento repetidas vezes ao longo do dia, mantendo-se níveis eficazes e seguros do fármaco em seu local de ação durante todo o período de tratamento.

Nos últimos anos, vislumbrou-se na nanotecnologia uma possibilidade real de desenvolver medicamentos alvo-específicos mais eficazes e seguros. A nanotecnologia é uma área emergente da ciência que se dedica ao desenvolvimento de sistemas estruturados em dimensões compreendidas normalmente nos valores de 0,1 a 500 nm, produzidos a partir dos mais diversos tipos de materiais, ou seja, a partir de polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores e biomateriais^{29,30}. O interesse por essa tecnologia está em explorar as novas propriedades que a matéria assume em dimensões tão reduzidas que se diferem de material em macroescala quanto às características ópticas, eletrônicas, magnéticas e biológicas^{28,30}.

No campo médico, os nanocarreadores têm sido eficazes em solucionar problemas relacionados à baixa biodisponibilidade de alguns fármacos, à sua instabilidade química e baixa solubilidade aquosa. Mais importante, os carreadores nanoestruturados mostram-se capazes de melhorar a absorção de fármacos, sustentar sua liberação e até vetorizar sua liberação, direcionando-os ao sítio de ação²⁸.

Dependendo da composição e estrutura, os carreadores nanoestruturados podem ser denominados nanopartículas, dendrímeros, nanotubos, nanoemulsões ou nanovesículas, entre as quais se destacam os lipossomas. O foco deste trabalho está na obtenção de nanopartículas.

Nanopartículas é a denominação geral dada a partículas sólidas e esféricas com diâmetros inferiores a algumas centenas de nanômetros. São dotadas de características diferenciadas de partículas com maiores dimensões ou agregado de partículas^{31,32}. Em dependência do material com o qual são preparadas, as

nanopartículas são classificadas como poliméricas, lipídicas sólidas, magnéticas ou metálicas.

1.4.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são partículas rígidas, habitualmente preparadas com polímeros biodegradáveis e têm atraído grande atenção de pesquisadores devido à sua capacidade de propiciar a liberação controlada das substâncias terapêuticas encapsuladas. Outras vantagens incluem a alta estabilidade dessas partículas nos fluidos biológicos durante o período de armazenamento³³.

De acordo com sua composição e organização estrutural, as nanopartículas podem se apresentar em forma de nanocápsulas ou nanoesferas (Figura 1.7A e Figura 1.7B, respectivamente). As nanocápsulas são constituídas de invólucro polimérico, disposto ao redor de um ou mais núcleos, estando o fármaco dissolvido no núcleo e ou adsorvido à parede polimérica. As nanoesferas são formadas por matriz polimérica, em que o fármaco se distribui homoganeamente em seu interior ou permanece adsorvido em sua superfície.^{28,33} As nanopartículas poliméricas têm apresentado aplicações promissoras, principalmente na vetorização de fármacos anticancerígenos³⁴, proteínas e peptídios³⁵, vacinas³⁶ e antibióticos³⁷.

Fármacos antitumorais nanoencapsulados (Figura 1.7), mesmo após administração sistêmica, acumulam-se preferencialmente nos tumores devido ao mecanismo de vetorização passiva, ou seja, há um acúmulo de nanopartículas nos tumores sólidos devido a uma alteração na fisiologia dos seus vasos. Essa modificação fisiológica ocorre devido ao aumento da permeabilidade do endotélio vascular na região do tecido tumoral, o que permite extravasamento tanto de líquidos quanto das próprias nanopartículas²⁸. As nanopartículas poliméricas podem ainda ser revestidas de polímeros como polietilenoglicol (PEG) com a função de prevenir sua opsonização por proteínas e aumentar a meia-vida desses carreadores na circulação sistêmica²⁸.

Outra promissora aplicação das nanopartículas é a administração oftálmica de fármacos^{38,39}. Já foi demonstrado experimentalmente que nanopartículas preparadas com polímeros mucoadesivos, como é o caso da quitosana, tendem a permanecer em contato com a mucosa ocular por um período mais longo e

aumentar a biodisponibilidade de fármacos, além de reduzir a ocorrência de efeitos adversos devido à absorção sistêmica da fração da preparação drenada pelo ducto nasolacrimal³⁹.

Entre os medicamentos comercializados na forma de nanopartículas poliméricas para liberação prolongada de fármacos, destaca-se o Abraxane[®] (paclitaxel), que é indicado para o tratamento sistêmico do câncer de mama⁴⁰. Esse medicamento é constituído de nanopartículas conjugadas à albumina com tamanho aproximado de 130 nm. As nanopartículas com albumina interagem com a proteína gp60, o que facilita o transporte do fármaco da circulação sistêmica para o sítio tumoral⁴¹.

No campo dermatológico, a indústria nacional Biolab trouxe nos últimos anos duas inovações em medicamentos com nanopartículas poliméricas: um creme anestésico de prilocaína e uma formulação para controle da alopecia com finasterida em sua composição^{42,43}. Ambas as formulações são compostas de nanocápsulas produzidas com um polímero biodegradável que liberam os fármacos de maneira sustentada na pele. Esses medicamentos, resultados de parceria entre a empresa farmacêutica e pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)⁴³, estão em testes clínicos de fase III. Sistemas com nanopartículas ou micropartículas de quitosana para direcionar a liberação do minoxidil para o folículo piloso, com vista ao tratamento tópico da alopecia, também vêm sendo desenvolvidos⁴⁴⁻⁴⁶.

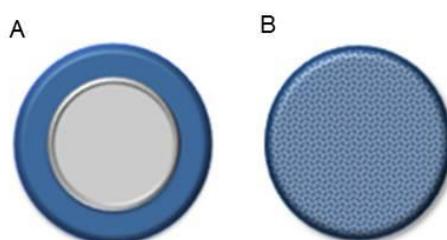


Figura 1.7. Representação esquemática das nanopartículas poliméricas. A) Nanocápsulas e B) Nanoesferas⁶².

O emprego de polímeros potencialmente mucoadesivos para preparo de nanopartículas para aplicação tópica em mucosas, principalmente direcionadas ao tratamento de tumores na região oral, ainda é pouco explorado na literatura.

1.5 Mucosa oral e Mucoadesão

A mucosa que compõe a cavidade oral é composta por um epitélio estratificado escamoso, que confere uma cobertura flexível para estruturas subjacentes, bem como uma barreira física contra a entrada de patógenos. Outros tipos celulares como os melanócitos e linfócitos também são encontrados na mucosa oral. Revestindo a mucosa, há uma camada de muco composta principalmente pela proteína mucina, além da lâmina própria e o muco-perióstico (Figura 1.8)^{47,48}.

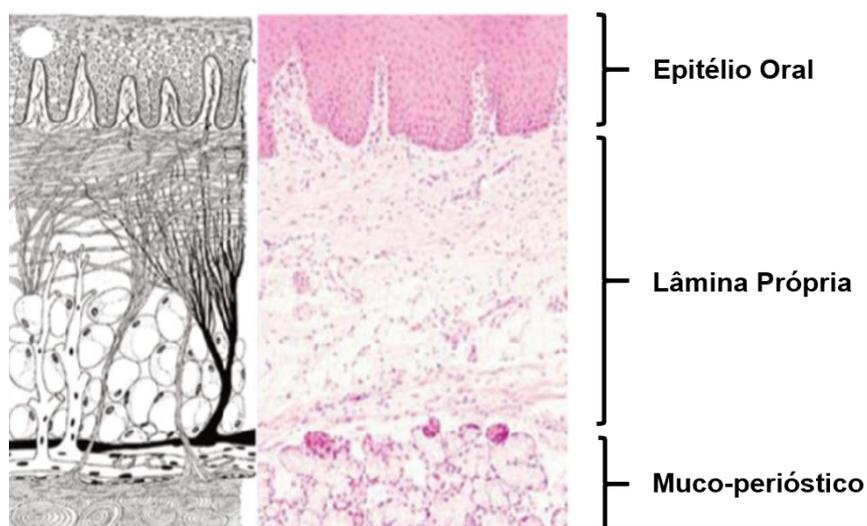


Figura 1.8. Histologia da mucosa oral humana saudável. A) Epitélio Oral, B) Lâmina própria, C) Muco-perióstico⁵⁵.

A cavidade oral inclui diferentes estruturas como a língua, o palato duro, o lábio e a gengiva, os quais mostram variabilidade estrutural considerável de acordo com sua função. Essas regiões podem ser usadas para a liberação de diferentes agentes terapêuticos tópicos para o tratamento de distúrbios locais, tais como doença periodontal, infecções bacterianas e fúngicas, estomatite aftosas e doenças vesicobolhosa, assim como cânceres orais⁵⁵⁻⁵⁷.

O epitélio da cavidade oral é adaptado para realizar diferentes funções fisiológicas. A principal diferença entre os seus diferentes tipos celulares é a presença regional de queratina em algumas áreas dessa mucosa. O palato duro e a gengivas são superfícies mucosas queratinizadas que suportam o estresse mecânico durante a mastigação e expressam queratinas de maior peso molecular,

tais como queratina 1 e 10. Este tecido é firmemente anexado ao tecido conectivo subjacente e ao osso⁵⁵⁻⁵⁶.

A mucosa não-queratinizada, que está localizada na região do assoalho da boca, regiões dos lábios e superfície da língua, é flexível suficiente para permitir a fala ou a acomodação de um bolo de alimento. As queratinas de baixo peso molecular, incluindo 4 e 13, são expressas nestes tecidos. Além das diferenças de expressão de queratina, existem diferenças regionais na espessura do tecido e no ciclo celular. A homeostase epitelial requer que a taxa de produção de células seja igual à taxa de descamação. A descamação contínua da camada de células mais externa reduz a quantidade de bactérias associadas às células epiteliais, limitando assim a colonização bacteriana.⁵⁵⁻⁵⁶

Os estudos de permeação são um complemento valioso para os estudos de absorção percutânea *in vivo* e fornecem informações importantes para avaliar a permeação dos fármacos através da mucosa. Uma variedade de sistemas de difusão passiva para experimentos de permeação *in vitro* foram desenvolvidos para elucidar os mecanismos de transporte pela mucosa oral, ou mesmo para a avaliação de potenciais promotores de penetração de fármacos^{55,56}.

Em estudos *in vitro* de permeação transmucosa é normalmente utilizada como modelo de tecido biológico a mucosa oral não-queratinizada de suínos. Isso porque estes tecidos são semelhantes à mucosa humana em termos de organização histológica, permeabilidade, e composição lipídica^{55,56}.

Como foi dito anteriormente, a mucosa oral é revestida por uma camada de muco. Alguns polímeros considerados mucoadesivos, sejam eles naturais ou sintéticos, interagem com a camada de muco cobrindo a superfície epitelial da mucosa. Esses polímeros permitem que a formulação seja direcionada para uma determinada região do corpo, melhorando assim a biodisponibilidade dos fármacos⁵⁸.

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, e pode ser obtida industrialmente pela hidrólise dos grupamentos aminoacetil da quitina a partir da hidrólise alcalina da carapaça de crustáceos. A quitosana possui várias características interessantes para a liberação controlada de substâncias em tecidos biológicos, como a mucosa oral ou até mesmo no olho. É um polímero hidrofílico mucoadesivo, biocompatível e biodegradável. Na verdade, os grupos amino

carregados positivamente da quitosana interagem com os resíduos de ácido siálico negativamente carregados de mucina, estendendo o tempo de contato do fármaco com o tecido alvo. O ácido hialurônico, presente na matriz extracelular de tecidos conectivos de vertebrados, é outro polímero natural que possui características mucoadesivas⁵⁸.

Algumas nanopartículas de PLGA foram preparadas pelo método de deposição do solvente e foram caracterizadas como mucoadesivas devido ao seu revestimento polimérico com o ácido poliacrílico, que tem propriedades bioadesivas⁵⁸⁻⁵⁹.

A capacidade de ligação dos polímeros à mucosa ocorre devido às forças de atrações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Apesar desses mecanismos de ligação ainda não serem completamente elucidados, uma teoria sugere que a bioadesão ocorra por meio das interações eletrostáticas, em que os polímeros carregados positivamente, como a quitosana, interajam com as cargas negativas presentes nas macromoléculas de mucina, em pH fisiológico^{58,59}.

A avaliação da mucoadesão das partículas desenvolvidas nesse trabalho, portanto, é um tópico importante para a pesquisa devido ao seu potencial em aumentar a liberação de fármacos, ao passo que promove um maior contato da formulação com o local de ação do fármaco⁵².

1.6 Iontoforese

O presente trabalho, além de propor o uso de nanopartículas mucoadesivas contendo o quimioterápico OXPt na tentativa de viabilizar um tratamento tópico efetivo para tumores orais, tem também o objetivo de estudar a influência da técnica de iontoforese para acelerar o acúmulo do fármaco na mucosa oral.

A iontoforese é um método não-invasivo e indolor de administração tópica e/ou transdérmica de fármacos baseada na movimentação de moléculas hidrofílicas, carregadas ou não, usando uma corrente elétrica de baixa intensidade. Essa opção de tratamento apresenta como principais características: i) uma liberação mais rápida do fármaco no tecido, ii) a capacidade de administrar macromoléculas para os tecidos superficiais e iii) um melhor controle da dose de fármaco administrada^{53,54}.

Tal técnica conecta o tecido a um circuito elétrico miniaturizado, promovendo um gradiente de corrente elétrica que causa a movimentação de íons. As moléculas carregadas movem-se em direção aos eletrodos de cargas opostas, que estão em contato com a superfície do tecido através de soluções eletrolíticas que também contêm o fármaco. Esse mecanismo permite a liberação de moléculas catiônicas, aniônicas e neutras, de modo que o fármaco catiônico ou neutro deverá ficar no eletrodo positivo, ao passo que fármacos aniônicos deverão ser colocados em contato com o eletrodo negativo (Figura 1.9)⁵⁴.

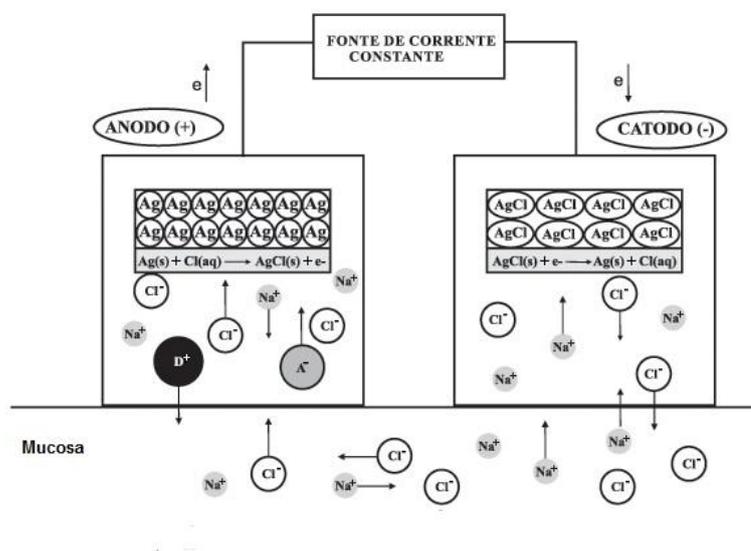


Figura 1.9. Iontoforese utilizando um sistema de eletrodos de Ag/AgCl. O ânodo contém um fármaco ionizável D⁺ e seu contra-íon A⁻ e Na⁺/Cl⁻⁴⁴.

Existem dois mecanismos que explicam o aumento da penetração tópica de moléculas sob a influência de um campo elétrico: eletromigração e a eletrosmose (Figura 1.10). A eletromigração ou eletrorrepulsão refere-se ao movimento ordenado de íons na presença de uma corrente elétrica aplicada ao meio, de modo que eletrodos de igual polaridade que a molécula promovem seu transporte para o interior da pele e mucosas, enquanto eletrodos de polaridade oposta atraem íons e moléculas carregadas para o exterior desses tecidos. Já a eletrosmose refere-se ao fluxo de um volume de solvente resultante da movimentação de eletrólitos para o interior da pele e mucosas quando uma corrente elétrica é aplicada, que em pH fisiológico é normalmente mais facilitado do eletrodo positivo em direção ao interior

do organismo devido às cargas negativas presentes na superfície da pele e na mucosa⁵⁴.

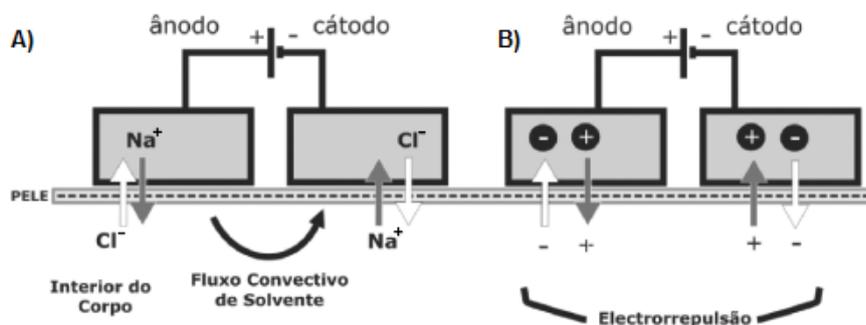


Figura 1.10. A) Eletromigração ou eletrorrepulsão: O eletrodo positivo repele fármacos de carga positiva, fazendo com que atravessem a mucosa. No eletrodo negativo, fármacos de cargas negativas são repelidos. B) Eletrosmose: O fluxo de um solvente fisiológico promovido pela corrente elétrica entre os eletrodos positivo e negativo permite a transferência de fármacos neutros⁴⁴.

A iontoforese transoral já tem sido utilizada para a liberação de fármacos como: atenolol, naltraxona, ondansetrona, lidocaína e nicotina. No entanto, o potencial de iontoforese para aplicação tópica de quimioterápicos na mucosa oral ainda não foi bem explorado⁶⁰.

O excelente controle oferecido pela iontoforese na cinética de liberação de fármacos quimioterápicos possui extrema importância, já que esses agentes, frequentemente, causam sérios efeitos adversos sistêmicos. A terapia iontoforética tópica não é somente uma alternativa não-invasiva à administração intravenosa de fármacos quimioterápicos, mas também reduziria a dose administrada, diminuindo assim os custos concomitantemente e o risco à exposição sistêmica. Desta forma, a liberação iontoforética local de anticancerígenos na mucosa oral pode ser uma alternativa eficaz e segura em comparação ao sistema quimioterápico intravenoso convencional, principalmente para para pacientes: (i) que receberão radioterapia, (ii) em quem a cirurgia não é indicada, (iii) onde os procedimentos cirúrgicos seriam muito invasivos ou limitariam as funções fisiológicas normais, (iv) onde a cirurgia já foi realizada sem remissão completa do câncer ou (v) no pré-operatório como um tratamento neo-adjuvante para reduzir o tamanho do tumor e, portanto, permitem um procedimento cirúrgico mais fácil e menos invasivo⁶⁰.

Dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho com a aplicação da iontoforese sobre as formulações contendo OXPt poderão gerar uma nova abordagem terapêutica quimioterápica, não-invasiva e eficiente, com o rápido acúmulo do fármaco sobre a região tumoral.

1.7 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar nanopartículas poliméricas mucoadesivas encapsulando a OXPt, a fim de servir como alternativa tópica e não-invasiva para o tratamento auxiliar de tumores orais.

Para se alcançar esse objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- Padronizar e validar um método analítico para quantificação do fármaco OXPt para dar suporte ao desenvolvimento da formulação;
- Realizar os ensaios de pré-formulação com a OXPt, determinando-se sua solubilidade, coeficiente de partição e compatibilidade com excipientes farmacêuticos de relevância no preparo da formulação;
- Otimizar o desenvolvimento e caracterizar nanopartículas de quitosana contendo a OXPt, seguindo parâmetros de tamanho e dispersão de tamanho, potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação;
- Avaliar a estabilidade físico-química da dispersão de nanopartículas;
- Determinar *in vitro* o perfil de liberação e cinética de liberação da OXPt a partir da dispersão de nanopartículas;
- Avaliar *in vitro* a mucoadesividade das nanopartículas desenvolvidas;
- Verificar *ex vivo* a penetração da OXPt nanoencapsulada em mucosa oral de suínos a partir da nanoformulação;
- Determinar *ex vivo* a influência da iontoforese sobre a penetração da OXPt na mucosa oral a partir da nanoformulação;

- Avaliar *in vitro* a atividade das formulações desenvolvidas na inibição do crescimento de células da linhagem SSC-9 de tumor de língua.

1.8 Referências

1. Chang, P. M. H.; Teng, H. W.; Chen, P. M.; Chang, S. Y.; Chu, P. Y.; Tsai, T. Methotrexate and leucovorin double-modulated 5-fluorouracil combined with cisplatin (MPFL) in metastatic/recurrent head and neck cancer. *Journal of the Chinese Medical Association*, v.71, n.7, p.41-336, 2008.
2. Shultz, J. D.; Bran, G.; Anders, C.; Sadick, H.; Fabers, A.; Hormann, K Induction chemotherapy with TPF (Docetaxel, Carboplatin and Fluorouracil) in the treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncology Reports*, v.5, n.24, p.6-1213, 2010.
3. Fernandes, G. M.; Bergmann, A.; Oliveira, J. F. Epidemiological analysis of population with head and neck cancer: influence on postoperative complications. *Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça Pescoço*. v.3, n.42, p.140-9, 2013.
4. Soares, M. C. S.; Silva, G.; Medeiros, C.M.R. Revisão integrativa sobre o câncer bucal. *Journal of Research of Fundamental Care Online*, v. (6i5), 164-175, 2014.
5. Furness, S.; Glenny, A. M.; Woryhington, H. V., Pavitt, S.; Oliver, R.; Clarkson, J. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n.4, 2011.
6. Kachnic, L. A.; Li, L.; Fournier, L.; Willers, H. Fanconi anemia pathway heterogeneity revealed by cisplatin and oxaliplatin treatments. *Cancer Letters*. v.1, n.292, p.9-73, 2010.
7. Brannon-peppas, L.; Soehl, K.; Monaco, M.D.; GARLICH, J.; Patterson, M.; Smith, T.C. Nanoparticles for delivery of pifithrins to combat cell death due to chemotherapy and radiation *Journal of Drug Delivery Science and Techonology*., v.14, n.4, p.257-264, 2004.

8. Faisant, N.; Siepmann, J.; Benoit, J.P. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.*, v.15, n.4, p.355-66, 2002.
9. Gavini, E.; Chetoni, P.; Cossu, M.; Alvarez, M.G.; Saettone, M. F.; Giunchedi, P. PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: in vitro/in vivo studies. *European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics.* v.57, p.207-12, 2004.
10. Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and applications. *Progress In Polymer Science.* v. 31, p. 603-632, 2006.
11. Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2018.
12. Colombo, J. e Rahal, P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia.* v.55, n.2, p.165-174, 2009.
13. Galbiatti, A. L. S.; Junior, J. A. P.; Maníglia, J. V; Rodrigues, C. D. S.; Pavarino, E. C.; Bertollo, E. M. G. Head and Neck câncer: causes, prevention and treatment. *Brazil Journal of Otorhinolaryngology.* v.79, n.2, p.239-47, 2013.
14. Fernandes, G. M.; Bergmann, A.; Oliveira, J. F. Epidemiological analysis of population with head and neck cancer: influence on postoperative complications. *Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça Pescoço,* v.3, n.42, p.140-9, 2013.
15. Furness, S.; Glenny, A. M.; Woryhington, H. V., Pavitt, S.; Oliver, R.; Clarkson, J. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database of Systematic Reviews,* n.4, 2011.
16. Hans, S.; Baduoal, C.; Gorphe, P.; Brasnu, D.; Transoral robotic surgery for head and neck carcinomas. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* v.269, n.8, p. 1979-1984, 2012.
17. Postner, M. R.; Paradigm shift in the treatment of head and neck cancer: the role of neoadjuvant chemotherapy. *Oncologist.* v.10, p.9-11, 2005.

18. Chi, A. C.; Day, T. A.; Neville, B. W. Oral cavity and Oropharyngeal Squamous Cells Carcinoma – An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. v.65, p.401-421, 2015.
19. Genden, E. M. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, v. 267, n.7, p.1001-1017, 2010.
20. Marta, G. N. Induction chemotherapy for oral cavity cancer patients: status and future perspectives. *Oral oncology*, v.51, n.12, p.1069-1075, 2015.
21. Galluzzi, L. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell death & disease*, v.5, n.5, p. e1257, 2014.
22. Ciarimboli, G.; Lancaster, C. S.; Schlatter, E.; Franke, R. M.; Sprowl, J. A.; Massmann, V.; Guckel, D.; Mathijssen, R. H.; Yang, W.; Pui, C. H.; Relling, M. V.; Herrmann, E.; Sparreboom, A. Proximal tubular secretion of creatinine by organic cation transporter OCT2 in cancer patients. *Clinical Cancer Research*. v.4, n.18, p. 1101-1108, 2012.
23. Kachnic, L. A.; Li, L.; Fournier, L.; Willers, H. Fanconi anemia pathway heterogeneity revealed by cisplatin and oxaliplatin treatments. *Cancer Letters*. v.1, n.292, p.9-73, 2010.
24. Huang, S.H.; O'Sullivan, B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. 2013.
25. Dilruba, S.; Kalayda, G. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v.77, n.6, p.1103-1124, 2016.
26. Alcindor, T.; Beauger, N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology*, v.18, n.1, 2011.
27. Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutical*. v.5, n.4, p.505-15, 2008.
28. Kim, B. Y. S.; Rutcka, J. T.; Chan, W. C. W. Nanomedicine. *The New England Journal of Medicine*. v.363, n.25, p.2434-43, 2010.

29. Duran, N; Mattoso, L.H.C.; de Moraes, P.C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber, 2006.
30. Ramsden, J. J. Applied nanotechnology: the conversion of research results to products. 2nd ed. Amsterdam, Holland: Elsevier; 2014.
31. Schaffazick, S.R.; Gutierrez, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Quimica Nova*. n.26, v.5, p.726-37, 2003.
32. Faria-Tischer, P.C.S.; Tischer, C.A. Nanobiotechnology, biomaterials and biological application of nanostructures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.1, n.1, p.32-53, 2012
33. Singh, M.N.; Hemant, K.S.Y.; Ram, M.; Shivakumar, H.G. Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Science*. v.5, n.2, p.65-77, 2010.
34. Babu, A.; Templeton, A. K.; Munshi, A.; Ramesh, R. Nanoparticle-based drug delivery for therapy of lung cancer: progress and challenges. *Journal of Nanomaterial*. v. 2013, n.14, p.1-11, 2013.
35. Mc Daniel, J. R.; Bhattacharya, J.; Vargo, K. B.; Hassouneh, W.; Hammer, D.A.; Chilkoti, A. Self-Assembly of thermally responsive nanoparticles of a genetically encoded peptide polymer by drug conjugation. *Angewandte Chemie International Edition Engl*. v.52, n.6, p.1683-87, 2012.
36. Bolhassani, A.; Javan zad, S.; Saleh, T.; Hashemi, M.; Aghasadeghi, M.R.; Sadat, S.M. Polymeric nanoparticles: potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. v.10, n.2, p.321-32, 2014.
37. Tan, F.; Sun, D.; Gao, J.; Zhao, Q.; Wang, X.; Teng, F.; Quan, X.; Chen J. Preparation of molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective removal of fluoroquinolone antibiotics in aqueous solution. *J Hazard Mater*. v.244, n.15, p.750-7, 2012.

38. Gratieri, T.; Gelfuso, G.M.; Rocha, E.M.; Sarmiento, V.H.; De Freitas, O.; Lopez, R.F. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.75, n.2, p.186-93, 2010.
39. Diebold, Y.; Jarrin, M.; Saez, V.; Carvalho, E.L.S.; Orea, M.; Calonge, M.; Seijo, B.; Alonso, M.J. Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). *Biomaterials*.v.28, p.1553-64, 2007.
40. Ibrahim, N. K.; Samuels, B.; Page, R.; Doval, D.; Patel, K.M.; Rao, S.C.; Nair, M.K.; Bhar, P.; Desai, N.; Hortobagyi, G.N. Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. v.23, n.25, p.6019-26, 2005.
41. Miele, E.; Spinelli, G. P.; Miele, E.; Tomao, F.; Tomao, S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*. v.4, p.99-105, 2009.
42. Da Silveira, E. Remédio em nanoescala. *Pesquisa FAPESP*. p.201:76-9, 2012.
43. Jornada, D. S.; Raffin, R. P.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S.S. Finasteride nanocapsules for topical administration. *In: II Mostra de Nanonociência e Nanotecnologia – CNANO – UFRGS, 2008, Porto Alegre. Anais*. p.56, 2008.
44. Gelfuso, G. M.; Gratieri, T.; Simão, P. S.; de Freitas, L.A.; Lopez, R.F. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. *Journal of Microencapsulation*. v.28, n.7, p.650-8, 2011.
45. Gelfuso, G. M.; Barros, M. A.; Delgado-Charro, M. B.; Guy, R. H.; Lopez, R. F. Iontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting? *Colloids Surface B Biointerfaces*. p.134:408-12, 2015.
46. Matos, B. N.; Reis, T. A.; Gratieri, T.; Gelfuso, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *International Journal of Biological and Macromolecules*. v.75, p.225-9, 2015.

47. Roblegg, E. Evaluation of a physiological in vitro system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa. *Nanotoxicology*, v.6, n.4, p.399-413, 2012.
48. Miller, N. M.; Chittchang, M.; Johnston, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v.57, n.11, p.1666-1691, 2005.
49. Neves, J. Mucoadhesive nanomedicines: characterization and modulation of mucoadhesion at the nanoscale. *Expert opinion on drug delivery*, v.8, n.8, p. 1085-1104, 2011.
50. By AlchemistOfJoy - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=23129860>.
51. Raymond, E.; Faivre, S.; Chaney, S.; Woynarowski, J.; Cvitkovic. Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin. *Molecular Cancer Therapeutics*. V.1, n.3, p.227-235, 2002.
52. Puratchilody, A. I. Buccal drug delivery: past, present and future-a review. *International Journal of Drug Delivery*, v.3, n.2, p.171, 2011.
53. Roustit, M.; Blaise, S.; Cracowski, J. L. Trials and tribulations of skin iontophoresis in therapeutics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.77, n.1, p.63-71, 2014.
54. Gratieri, T.; Gelfuso, G.; Lopez, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quim Nova*, v.31, n.6, p.1490-1498, 2008.
55. Chen, J.; Ahmad, R.; Li, W.; Swain, M.; Li, Q. Biomechanics of Oral Mucosa. *Journal Release Society Interface*. v.12, p. 1-20, 2015.
56. Amores, S.; Domenech, J.; Colom, H.; Calpena, A. C.; Clares, B.; Gimeno, A.; Lauroba, J. An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.60, p.49-54, 2014.

57. Groppo, F. C.; Lopez, R. F. V.; Paula, E.; Volpato, M. C.; Novaes, P.D.; Santos, C. P.; Silva, C. B.; Martinelli, C. C. M.; Serpe, L.; Franz-Montan, M. Evaluation of different pig oral mucosa sites as permeability barrier models for drug permeation studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.81, p. 52-59, 2016.
58. Silva, M. M.; Calado, R.; Marto, J.; Bettencourt, A.; Almeida, A. J.; Gonçalves, L. M. D. Chitosan Nanoparticles as a Mucoadhesive Drug Delivery System for Ocular Administration Marine Drugs, v.15, p. 370, 2017.
59. Bhosale, U. V.; Kusum, D. V.; Jain, N. Formulation and Optimization of Mucoadhesive Nanodrug Delivery System of Acyclovir. *Journal of Young Pharmacists*. v.3, n.4, p. 275-283, 2011.
60. Gratieri, T. e Kalia, Y. N. Targeted local simultaneous iontophoresis of chemotherapeutics for topical therapy of head and neck cancers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.460, p.24–27, 2014.
61. Chen, L. F.; Vokes, E. E. Peptic ulcer diseases. *ACP Medicine*. The original English language work has been published by DECKER INTELLECTUAL PROPERTIES INC. Hamilton, Ontario, Canada. Copyright © 2011 Decker Intellectual Properties Inc. All Rights Reserved 2018.
62. Matos, B. N.; Oliveira, P. M. ; Areda, C. A. ; Cunha-Filho, M. S. S. ; Gratieri, T.; Gelfuso, G. M. . Preparações farmacêuticas e cosméticas contendo nanotecnologia. *BRASÍLIA MÉDICA*, 2017.

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO SIMPLES E SELETIVO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE OXALIPLATINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Neste capítulo experimental da tese serão apresentados dados referentes ao desenvolvimento e à validação de um método analítico cromatográfico simples e seletivo para a quantificação da OXPt. Esse método dará suporte aos experimentos subsequentes envolvidos no desenvolvimento e avaliação da formulação nanoestruturada contendo o agente quimioterápico.

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Material

A OXPt (platinum(4+) ion (1R,2R)-cyclohexane-1,2-diaminide oxalate, $C_8H_{12}N_2O_4Pt$, 99.0%) utilizada nesse trabalho foi adquirida da Sigmagchem (Xiamen, China). Quitosana de baixo peso molecular (QBPM) (PM, 50,000-190,000 Da e grau de desacetilação 75-85%), poloxamer 407 (POLOX) e ácido fosfórico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Acetonitrila e metanol grau HPLC foram adquiridos da J.T Barker (Philisburg, USA). Todas as análises foram realizadas com água Milli-Q (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

2.1.2 Preparo da solução estoque

Soluções estoque de OXPt ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram preparadas dissolvendo-se 10 mg do fármaco em 100 mL de água ultrapurificada. Essas soluções foram utilizadas para preparo das curvas de calibração por diluição em água.

2.1.3 Desenvolvimento do método

O desenvolvimento do método foi inicialmente baseado na seleção do comprimento de onda de máxima absorção do fármaco utilizando-se um espectrofotômetro (Lambda Bio model, PerkinElmer, United Kingdom). Diferentes condições cromatográficas foram então testadas, tais como composição da fase móvel, vazão e volume de injeção, de acordo com o que está apresentado na Tabela 2.1 abaixo, de modo a se obter picos cromatográficos com critérios analíticos adequados.

2.1.4 Condições cromatográficas

A OXPt foi dosada com o auxílio de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE, Shimadzu LC 20-AD, Kyoto Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico DAD (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm) da Dionex Co. (Salt Lake City, UT, USA). A fase móvel foi composta por uma mistura de solução aquosa ácida (0,01 M ácido fosfórico):acetonitrila (95:5, v/v). A vazão foi de 1 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 20 µL, o forno foi utilizado à temperatura de 25°C e a detecção no UV foi realizada em 255 nm.

2.1.5 Validação do Método

O método foi validado de acordo com o guia Q2 (R1) do Institute Conference and Harmonization (ICH) em termos de especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

a) Especificidade/Seletividade

A especificidade foi avaliada injetando-se no CLAE amostras de OXPt contaminadas ou não com quitosana e poloxamer, os principais biopolímeros com potencial mucoadesivo utilizados para o preparo de formulações.

Seis soluções estoque independentes foram preparadas como descrito anteriormente (item 2.1.2) e diluídas a uma concentração nominal de 5 µg.mL⁻¹ de OXPt para a análise em CLAE. Então, essas mesmas seis soluções de OXPt foram contaminadas com os dois polímeros a uma concentração também igual a 5 µg.mL⁻¹ para os polímeros e foram reanalisadas. Os resultados de área do pico e tempo de retenção foram avaliados com teste estatístico ANOVA *one-way* com nível de significância de 0,05.

b) Linearidade

Foram preparadas 3 curvas de calibração com uma faixa de concentração de OXPt entre 0,5 e 15 µg.mL⁻¹ a partir de três soluções estoque diferentes. A

linearidade foi avaliada a partir da regressão linear da curva obtida plotando-se concentração *versus* área do pico cromatográfico. O coeficiente angular e testes de proporcionalidade foram avaliados utilizando-se o teste *t-student*. Homogeneidade da variância e normalidade dos resíduos foram conferidos por ANOVA *one-way* com nível de significância de 0,05. Fatores de resposta linear foram calculados a partir da relação entre a área dos picos e a concentração teórica de OXPt. A análise desse parâmetro foi avaliada a partir das médias dos fatores de resposta e o seu coeficiente de variação.

c) Precisão e exatidão

Precisão e exatidão foram determinadas em termos de recuperação de concentrações conhecidas de OXPt. As amostras foram preparadas em três níveis da curva de calibração (0,5; 3,0 e 15,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As análises foram realizadas no mesmo dia para determinar variabilidade intra-corrída e em dias diferentes para se estabelecer a variabilidade inter-corrída. A precisão foi avaliada calculando-se o coeficiente de variação (CV) e a exatidão foi avaliada calculando-se o erro (E), de acordo com as equações abaixo:

$$CV = (|100 - AV| * \sqrt{n}) / Z \quad (1),$$

Onde: CV é o coeficiente de variação da repetibilidade do método (análise intracorrída), AV é o valor de aceitação, n é o número de replicatas e Z ($\alpha=0,01$) é 2,68¹⁶.

$$E\% = (\text{Concentração Obtida} / \text{Concentração teórica}) \times 100 \quad (2),$$

Onde: (E%) corresponde à porcentagem de recuperação, valor obtido corresponde à concentração obtida após a análise, e o valor real corresponde à concentração do padrão que deveria ser encontrado na análise.

O número apropriado de replicatas para análise experimental analítica contendo OXPt foi estimado a partir da repetibilidade do método, baseado no intervalo de confiança de 98-102%.

d) Limite de quantificação e limite de detecção

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram definidos a partir das equações descritas abaixo:

$$LD = (3 \times s) / S \quad (3),$$

$$LQ = (10 \times s) / S \quad (4),$$

Onde: s é o desvio padrão do intercepto no eixo Y da curva de calibração e S é o coeficiente angular da curva de calibração.

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Desenvolvimento do Método Cromatográfico

A absorbância máxima em UV da OXPt ocorreu em 255 nm; logo, esse comprimento de onda foi estabelecido para todas as análises do fármaco. As principais variações nas condições cromatográficas para otimização do método analítico estão descritas na Tabela 2.1. A fase móvel composta por metanol e água estabeleceu uma baixa interação entre o fármaco e a coluna, resultando em uma rápida eluição da OXPt. Igualmente, fases móveis contendo diferentes proporções de água e acetonitrila resultaram em uma eluição precoce da OXPt (antes de 2 minutos), apresentando picos com fatores de simetria inadequados.

Tabela 2.1. Variação das condições do método analítico. Amostras de OXPt (15,0 µg.ml⁻¹) foram analisadas por CLAE usando uma coluna C₁₈, com detecção de UV fixado em 255 nm, a 25°C.

Fase móvel (v:v)	Volume de injeção (µL)	Vazão (mL/min)	Resultado
Acetonitrila : Água (90:10)	50	1	Cauda
Acetonitrila: Água (80:20)	50	1	Cauda
Acetonitrila : Água (70:30)	50	1	Cauda
Acetonitrila : Água (50:50)	50	1	Cauda
Acetonitrila : Água (20:80)	50	1	Cauda
Acetonitrila : água : Metanol (60:30:10)	50	1	Ponta
Metanol : água (85:15)	50	1	Volume morto
Metanol : água (65:35)	50	1	Volume morto
Metanol : água (70:30)	10	0,5	Cauda
Metanol : água (70:30)	30	0,3	Ombro
Metanol : água (30:70)	50	1	Ombro
Solução ácida : acetonitrila (80:20)	20	1	Volume morto
Solução ácida : acetonitrila (90:10)	20	1	Volume morto
Solução ácida : acetonitrila (95:5)	20	1	Pico adequado

A OXPt é uma substância hidrossolúvel, que apresenta pKa igual a 6,1¹². Em valores de pH abaixo do pKa, a polaridade da molécula diminui, permitindo uma maior interação entre o fármaco e a coluna apolar C₁₈. Dessa forma, foi utilizada uma solução aquosa de ácido fosfórico 0,01M (pH 3,5) como solvente polar, com o intuito de se obter melhores resultados em termos de separação e qualidade do pico. A mistura de ácido fosfórico: acetonitrila na proporção de 95:5, (v/v) de fato mostrou ser a composição de fase móvel mais adequada para a separação do pico com um tempo de retenção apropriado (3,7 minutos, Figura 2.1).

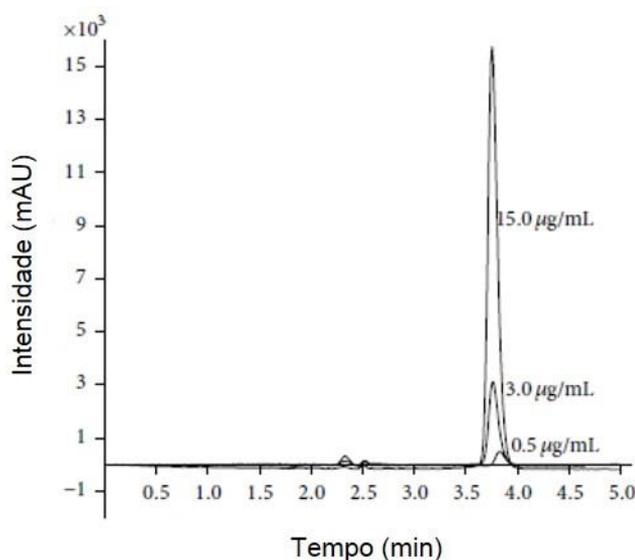


Figura 2.1. Sobreposição dos cromatogramas por CLAE das soluções aquosas de OXPt analisadas em diferentes concentrações (0,5; 3,0 e 15,0 µg.mL⁻¹).

2.2.2 Especificidade

A especificidade é um parâmetro importante na validação de um método analítico. Nesse trabalho, o desenvolvimento do método analítico é baseado na quantificação da OXPt a partir de formulações mucoadesivas compostas pelos polímeros de quitosana e poloxamer¹³.

Experimentos anteriores realizados utilizando espectrofotometria no UV não se mostraram seletivos para as soluções dos polímeros, visto que elas absorviam a luz no mesmo comprimento de onda de absorção máximo do fármaco. Por isso, um equipamento mais seletivo como o CLAE foi escolhido para as análises.

A Figura 2.2 mostra a sobreposição dos cromatogramas das soluções de OXPt contaminadas com os polímeros. Os picos do fármaco estão claramente

separados dos picos do solvente (fase móvel) e dos polímeros em todas as situações. Nas condições de análise, os polímeros não mostraram resposta detectável próxima ao tempo de retenção da OXPt, permitindo uma detecção confiável do fármaco na presença dos polímeros.

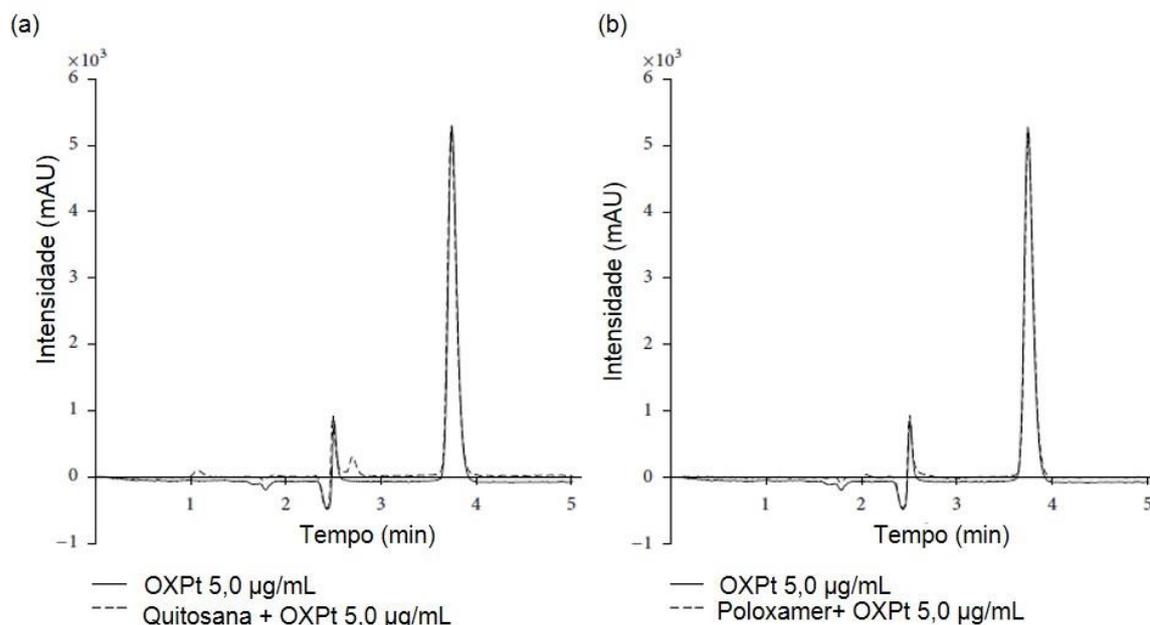


Figura 2.2. Sobreposição dos cromatogramas por CLAE de uma solução simples de OXPt ($5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e soluções de oxaliplatina contaminadas com $5,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ de (a) quitosana ou (b) poloxamer.

As áreas dos picos e os tempos de retenção das amostras de OXPt contendo ou não os interferentes foram comparadas para se avaliar a capacidade de reprodutibilidade do método analítico na presença dos contaminantes (Figura 2.3).

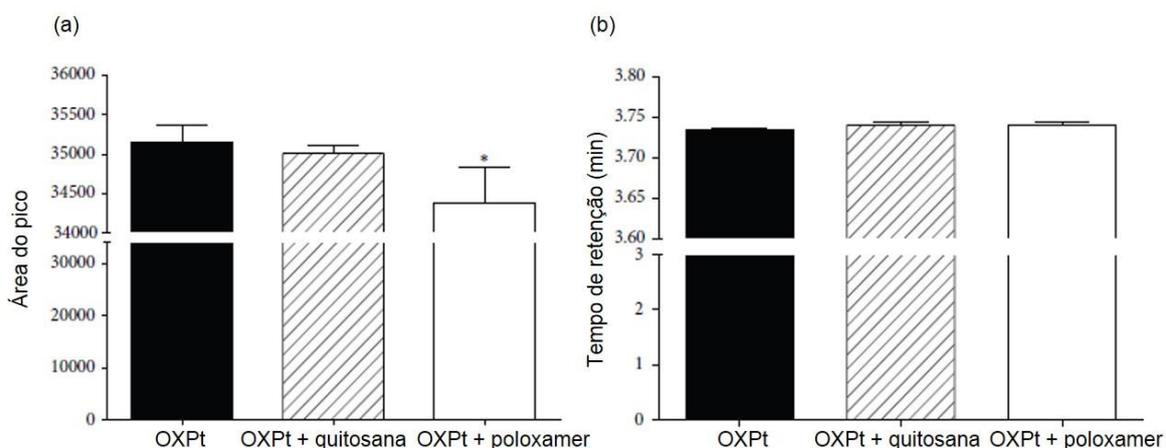


Figura 2.3. Seletividade do método de quantificação de OXPt ($5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sozinha, com quitosana ($5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e com poloxamer ($5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), analisados em termos de diferenças entre (a) as áreas dos picos e (b) os tempos de retenção. * $p < 0,05$.

As áreas dos picos de OXPt apresentaram uma diferença estatística (ANOVA) na presença do poloxamer (Figura 2.3a: $p = 0,008$ e $\alpha = 0,05$), enquanto a quitosana não interferiu significativamente na resposta. Entretanto, considerando-se que a alta quantidade de polímero na amostra ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) somente reduziu a área do pico de OXPt em 2%, considerou-se essa margem segura para a análise de OXPt na presença desse polímero. A análise estatística ANOVA não apresentou diferença estatística entre os tempos de retenção da OXPt na presença ou ausência dos polímeros, sendo as variações ocorridas atribuídas ao erro aleatório ($p = 0,015$, $\alpha = 0,05$).

2.3.3 Linearidade

A curva analítica obtida para a OXPt está apresentada na Figura 2.4. A análise de variância (ANOVA) confirmou a linearidade da curva, homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos, os quais foram distribuídos sem tendência.

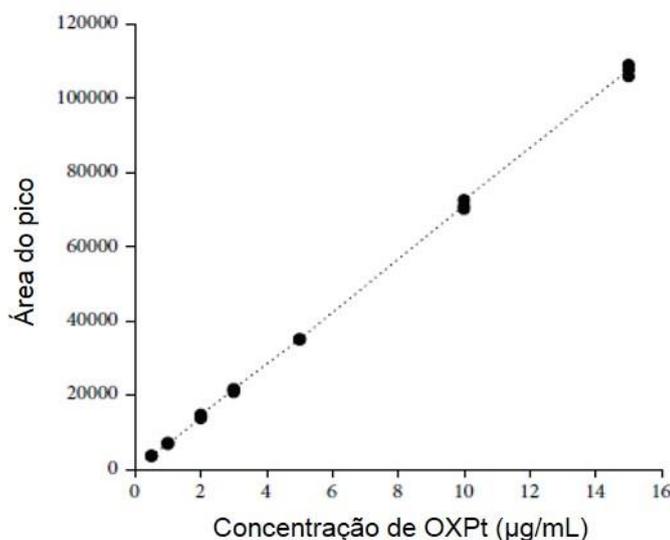


Figura 2.4. Representação gráfica da curva analítica obtida para a OXPt por CLAE ($y = 7159,7x - 140,9$; $r = 0,9998$; $n = 3$).

O coeficiente de correlação linear ($r = 0,9998$) mostrou uma alta probabilidade de correlação entre as variáveis (concentração e área do pico) e segue a recomendação mínima de $0,99^{14}$.

O teste de proporcionalidade mostrou que a ordenada ($140,9$) é significativamente diferente de zero. Esse valor é menor que 1% da resposta do

analito baseado na concentração teórica, preenchendo outro parâmetro analítico requerido.

A inclinação da curva é diferente de zero ($t = 217,9$; $\alpha = 0,05$) e o seu alto valor (7159,7) indica boa sensibilidade metodológica. Os valores médios dos fatores de resposta (7151,4) foram muito próximos ao valor de inclinação (7159,7), indicando uma calibração linear dos resultados. O coeficiente do fator de resposta da variação foi 2,5%, menor do que os 5% recomendados pelo ICH¹⁴.

Baseados nos dados apresentados, o método se mostrou linear, apresentando todos os parâmetros necessários dos protocolos internacionais para validação de métodos¹⁴.

2.3.4 Precisão e exatidão

Os resultados de precisão e exatidão da quantificação de OXPt (intra- e intercorrida) estão apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Precisão (CV) e exatidão do método por CLAE para a quantificação de OXPt.

Concentração teórica ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração Experimental (média \pm DP; $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CV (%) ^a	Exatidão ^b
Intracorrída (n = 9)			
0,5	0,54 \pm 0,01	1,75	104,33
3,0	3,00 \pm 0,07	2,32	100,07
15,0	15,04 \pm 0,22	1,45	100,26
Intercorrída (n = 9)			
0,5	0,52 \pm 0,01	1,66	104,79
3,0	2,86 \pm 0,12	4,17	95,28
15,0	14,82 \pm 0,08	0,57	98,77

^aCoefficiente de Variação (CV) = (DP/média); ^bexatidão = (concentração experimental/concentração teórica) x 100.

A precisão foi avaliada para identificar erros aleatórios que não podem ser controlados, como por exemplo tempo de análise, reagentes, acurácia das vidrarias e preparo de amostras¹⁵. Para intra e intercorrida, os coeficientes de variação (CV%) variaram entre 0,6% e 4,2%. Esses valores estão de acordo com o máximo

limite de 5% proposto pelos órgãos internacionais de validação¹⁵. O CV obtido da repetibilidade (intracorrída) também permitiu estimar (equação 3) que é recomendado no mínimo 5 réplicas durante a rotina de análise, considerando CV% médio de 1,8% (Tabela 2.2). A recuperação do fármaco foi de 95,3% a 104,3%. Esses valores também estão de acordo com os limites de aceitação para recuperação em matrizes farmacêuticas determinado pelo ICH¹⁴, indicando uma proximidade entre os valores obtidos e teóricos de OXPt.

2.3.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram calculados e são 0,099 e 0,331 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Dessa forma, o método analítico proposto é sensível para a análise da OXPt nas formulações farmacêuticas, assim como pode ser útil para determinar a cinética de liberação do fármaco pela matriz polimérica em que ele será inserido.

2.4 Conclusão

O método CLAE mostrou-se seletivo para a quantificação da OXPt em formulações farmacêuticas. O método foi capaz de quantificar a OXPt na presença de qualquer interferente, como solventes e os polímeros quitosana e poloxamer. Precisão, exatidão, e baixos valores de LD e LQ também foram demonstrados durante todas as análises realizadas.

2.5 Referências

1. He, H.; Xiao, H.; Kuang, H.; Xie, Z.; Chen, X.; Jing, X.; Huang, Y. "Synthesis of mesoporous silica nanoparticle–oxaliplatin conjugates for improved anticancer drug delivery", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.117, p.75-81, 2014.
2. Alcindor, T., and Beauger, N., "Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy", *Current Oncology*, v.18, n.1, p.18-25, 2011.
3. Arango, D.; Wilson, A. J.; Shi, Q.; Corner, G. A.; Arañes, M. J. ; Nicholas, C.; Lesser, M.; Mariadason, J. M.; Augenlicht, L. H. "Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells", *British Journal of Cancer*, v.91, n.11, p.1931-46, 2004.

4. Beijers, A. J. M.; Mols, F.; Vreugdenhil, G. "A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration", *Supportive Care in Cancer*, v.22, n.7, p.1999-2007, 2014.
5. Vivek, R.; Thangam, R.; Nipunbabu, V.; Ponraj, T.; Kannan, S. "Oxaliplatin-chitosan nanoparticles induced intrinsic apoptotic signaling pathway: a "smart" drug delivery system to breast cancer cell therapy", *International Journal of Biological Macromolecules*, v.65, p.289-297, 2014.
6. Franzen, U.; Nguyen, T. T.; Vermehren, C.; Gammelgaard, B; Ostergaard, J. "Characterization of a liposome-based formulation of oxaliplatin using capillary electrophoresis: encapsulation and leakage", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.55, n.1, p.16-22, 2011.
7. Zhou, H.; Qiu, L. P.; Yan, X. X.; Li, L.; Li, X.; Wang, L.; Liu, M.; Wang, D. K. "Preparation and characterization of oxaliplatin-loaded nanostructured lipid carriers". *Yao Xue Xue Bao*, v.45, n.9, p.1177-1182, 2010.
8. Okayama, T.; Ishikawa, T.; Sugatani, K. "Hypersensitivity reactions to oxaliplatin: identifying the risk factors and judging the efficacy of a desensitization protocol", *Clinical Therapeutics*, v.37, n.6, p.1259-1269, 2015
9. Grewal, G. D.; Badrick, T. C.; Gilbar, P. J. "Immediate and delayed hypersensitivity reactions to a single dose of oxaliplatin", *Clinical Colorectal Cancer*, v.14, p.128-130, 2015.
10. Gallinella, B.; Bucciarelli, L.; Zanitti, R.; Ferretti, R.; Cirilli, R., "Direct separation of the enantiomers of oxaliplatin on a cellulose-based chiral stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography mode", *Journal of Chromatography A*, v.1339, p.210-213, 2014.
11. Martinčič, M.; Cemazar, G.; Sersa, V.; Kovač, R.; Milačič, J. Ščančar, "A novel method for speciation of Pt in human serum incubated with cisplatin, oxaliplatin and carboplatin by conjoint liquid chromatography on monolithic disks with UV and ICP-MS detection", *Talanta*, v.116, p.141-148, 2013.

12. Zhang, S.; Lovejoy, K. S.; Shima, J. E.; Lagpacan, L. L.; Shu, Y.; Lapuk, A.; Chen, Y. Komori, T.; Gray, J. W.; Chen, X.; Lippard, S. J.; Giacomini, K. M. "Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity", *Cancer Research*, v.66, n.17, p. 8847-8857, 2006.
13. Liu, J.; Xiao, Y.; Allen, C. "Polymer-drug compatibility: a guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.93, n.1, p.132–143, 2004.
14. ICH. Q2(R1), "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use", Geneva, 2005.
15. Cunha-Filho, M. S. S.; Gonçalves, C. A. T.; Santos Soares, P. R.; Sá-Barreto, L. C.; Martinez-Pacheco, R.; Landin, M. "Validation of analytical method and development of dissolution test for the antineoplastic beta-lapachone", *Latin American Journal of Pharmacy*, v.6, p.805-811, 2009.
16. Hooker, S. C.; Shepard, H. W.; Walsh, J. G.; Connitt, G. H "The constitution of lapachol and its derivatives. part v. the structure of paternò's isolapachone^{1,2}" *Journal of the American Chemical Society*, v.58, p1190–1197, 1936.

CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA OXALIPLATINA E COMPATIBILIDADE COM OS POLÍMEROS DE MAIOR RELEVÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADOS

Neste capítulo serão apresentados resultados referentes à obtenção de dados físico-químicos da OXPt, bem como à realização de ensaios que buscam avaliar a compatibilidade química deste fármaco com polímeros utilizados no preparo de nanopartículas e outras formulações farmacêuticas. Esses ensaios de pré-formulação serviram de referência ao processo de desenvolvimento e avaliação das nanopartículas de quitosana contendo a OXPt, que será tratado no capítulo seguinte.

3.1 Material e Métodos

3.1.1 Material

A OXPt (platinum(4+) ion (1R,2R)-cyclohexane-1,2-diaminide oxalate, $C_8H_{12}N_2O_4Pt$, 99.0%) utilizada neste trabalho foi adquirida da Simagchem Co. (Xiamen, China). Os polímeros, Quitosana de baixo peso molecular (QBPM), Quitosana de médio peso molecular (QMPM) (PM, 50,000-190,000 Da e grau de desacetilação 75-85%), poloxamer 407 (POLOX) e Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) MM% (50/50) e o sal HEPES foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Todos os solventes e outros reagentes usados neste estudo são de grau analítico e foram utilizados sem demais purificações. Todas as preparações foram realizadas com água ultrapurificada (Milipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

3.1.2 Determinação da solubilidade da OXPt

Um excesso de OXPt foi adicionada em água e tampão HEPES 25,0 mM isotonzado com NaCl (pH $7,4 \pm 0,01$). As suspensões foram agitadas por 24 h em um *shaker* oscilatório a 25°C (Phoenix AP-22, Brazil). As amostras foram filtradas em filtros de porosidade de 0,22 μm e propriamente diluídas antes da análise quantitativa. O experimento foi realizado em triplicata e analisado por

espectrofotômetro PerkinElmer Lambda XLS (Massachusetts, EUA) em comprimento de onda de 255 nm.

3.1.3 Determinação do coeficiente de partição octanol/água ($K_{o/w}$)

O coeficiente de partição octanol-água ($K_{o/w}$) da OXPt foi determinado pelo método do “*shake flask*”. Uma solução inicial de OXPt ($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi preparada utilizando-se água Milli-Q pré-saturada com 1-octanol. Depois, 10 mL desta solução inicial foi adicionado em erlenmeyers e 1 mL foi removido para análise antes de partição (P1). Nos mesmos erlenmeyers foram adicionados 9 mL de 1-octanol previamente saturado com água. Este sistema foi mantido sob agitação de 500 rpm durante 24 h. As amostras foram colocadas em um funil de separação sem perturbação por 5 min e separadas em suas fases aquosa e oleosa. A fase aquosa foi centrifugada (CentriBio TDL80-2B) durante 10 min a 3000 rpm para assegurar uma separação completa da fase oleosa. Esta fase foi filtrada com filtro de $0,45 \mu\text{m}$ da marca Millipore e analisada em um espectrofotômetro PerkinElmer Lambda XLS (Massachusetts, EUA) a 255 nm (P2). O $K_{o/w}$ foi calculado utilizando a equação:

$$K_{o/w} = P1 - P2 / P1 \quad (5)$$

3.1.4. Preparo das amostras

Misturas binárias de OXPt com cada um dos polímeros (POLOX, QBPM, QMPM e PLGA) foram preparadas pesando-se quantidades iguais de cada componente e misturando-as com o auxílio de um vortex para garantir a homogeneização das amostras.

Os materiais utilizados para o estudo de compatibilidade OXPt-polímero (somente OXPt, somente polímeros e suas misturas binárias) foram submetidos a estresse térmico e de luz. O estresse de luz foi realizado expondo as amostras à radiação ultravioleta em câmara de fotoestabilidade durante 24h (Caron UV/VIS, EU) seguindo as recomendações do ICH¹¹. O estresse térmico foi realizado aquecendo as amostras em mufla (FI-PQ, EDG Equipamentos, Brasil) a uma taxa de $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até $150 \text{ }^\circ\text{C}$. As temperaturas selecionadas para este tratamento estavam abaixo da temperatura de decomposição de todos os materiais utilizados.

As amostras submetidas a testes térmicos não receberam nenhum aquecimento prévio, somente o aquecimento fornecido durante a análise.

3.1.5 Caracterização térmica

Curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas utilizando-se um DSC-60A (Shimadzu, Japão). Amostras de 2-4 mg foram pesadas em *pans* de alumínio e foram analisadas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, vazão de 50 mL.min⁻¹, a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

Variações de perda de peso e faixas de decomposição foram avaliadas por meio de *Derivative thermogravimetry* (DTG) utilizando uma termobalança DTG-60 (Shimadzu, Japão) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, vazão de 50 mL.min⁻¹. Amostras de 4 mg foram pesadas em *pans* de platina não herméticas e foram analisadas usando taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, com temperatura inicial em 25 °C até a temperatura de degradação de cada amostra.

A cinética de degradação da QBPM e QMPM e suas misturas binárias com OXPt foram analisadas de acordo com os experimentos de termogravimetria isotérmica¹². As amostras foram aquecidas a 10 °C.min⁻¹ até a uma temperatura próxima à degradação do polímero e, então, mantidas em temperatura constante por um período suficiente para reduzir em 5% do peso da amostra. Foram testadas diferentes temperaturas entre 230 e 250 °C. A equação de Arrhenius foi, em seguida, utilizada com base nos dados experimentais para determinar as energias de ativação de cada uma das amostras.

3.1.6 Caracterização molecular

Espectroscopia de infravermelho (FTIR) foi realizada com comprimentos de onda variando de 4000 a 600 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹ em um espectrômetro Varian 640-IR FTIR com acessório Imaging ATR (Varian Inc., Brasil), em pó.

3.1.7 Caracterização cristalográfica

Determinações de difração de pó de raio X, do inglês *X-ray powder diffraction* (XRPD), foram realizadas nas amostras em pó com um difratômetro Miniflex 600 (Rigaku, Japão) equipado com um detector de cintilação de alta velocidade e monocromador de grafite usando radiação de 1,541 Å, 40 kV e 30 mA.

3.1.8 Análises morfológicas

Características morfológicas das amostras foram analisadas usando um estereomicroscópio SZ-SZT conectado a uma videocamêra (Laborana, Brasil). O processamento das imagens foi realizado utilizando o *software* ISCapture, versão 2.2.1.

3.2 Resultados e Discussão

Neste trabalho foram realizados ensaios para determinar as características físico-químicas da OXPt e sua compatibilidade com matrizes poliméricas relevantes ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, como quitosana de baixo e médio peso molecular, poloxamer e PLGA. Informações químicas e farmacêuticas da OXPt obtidas com estes testes serão utilizadas como base para obtenção de sistemas de liberação que deverão auxiliar no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento tópico de tumores de pele e mucosa.

3.2.1 Classificação biofarmacêutica da OXPt

O guia do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) categoriza os ativos farmacêuticos em quatro categorias de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade. Essas duas propriedades combinadas determinam, em última instância, a farmacocinética do fármaco¹⁴.

A solubilidade da OXPt em água e em tampão HEPES pH 7,4 foram iguais a $8,02 \pm 0,23 \text{ g.L}^{-1}$ e $8,74 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, estando em acordo com os dados previamente relatados na literatura ($8,0 \text{ mg.mL}^{-1}$)¹⁵.

A alta solubilidade aquosa pode ser explicada pela presença de grupos eletronegativos da molécula de OXPt, que facilitam a solvatação da molécula em água, com possível formação de ligações de hidrogênio ou interações dipolo-dipolo.

O coeficiente de partição ($\log P$) é uma medida indireta da permeabilidade do fármaco através de membranas biológicas¹⁶. Determinações *in sílico* do $\log P$ da OXPt mostram resultados muito dispersos, com valores que variam entre 0,04 (ALOGPS 2.1) a 1,73 (ChemAxon). Os ensaios experimentais deram origem a um $\log P = -2,06 \pm 0,22$, diferentemente dos resultados *in sílico*, mas consistentes com dados experimentais encontrados na literatura de $\log P$ OXPt = $-1,65$ ¹⁷. Este valor

de $\log P$ é muito inferior ao limite indicativo que fármacos permeiam facilmente membranas biológicas, ou seja, $\log P > 1,7^{17}$, indicando o caráter hidrófilo da OXPt e uma provável dificuldade em permear membranas biológicas.

Portanto, os dados experimentais de solubilidade e permeabilidade da OXPt permitem classifica-la como um fármaco de classe III de acordo com a SCB, uma vez que a OXPt exibe alta solubilidade e baixa permeabilidade.

3.2.2 Perfil físico-químico da OXPt

Simulação das condições de produção farmacêutica foram realizadas submetendo OXPt sólida a exposição térmica e luminosa a fim de avaliar a estabilidade química e física do fármaco.

O espectro de FTIR da OXPt apresentou bandas em 3726, 3703, 3626 e 3597 cm^{-1} (grupos amino), 1696 e 1662 cm^{-1} (grupos carbonila), 1611 e 1368 cm^{-1} (grupos éster) e 808 cm^{-1} (ligação Pt-O) (Figura 3.1). Após envelhecimento forçado das amostras, não houve nenhum sinal de decomposição da OXPt, uma vez que as bandas relacionadas aos grupos funcionais do fármaco mantiveram-se inalteradas nas amostras estressadas, tal como indicado na Figura 3.1.

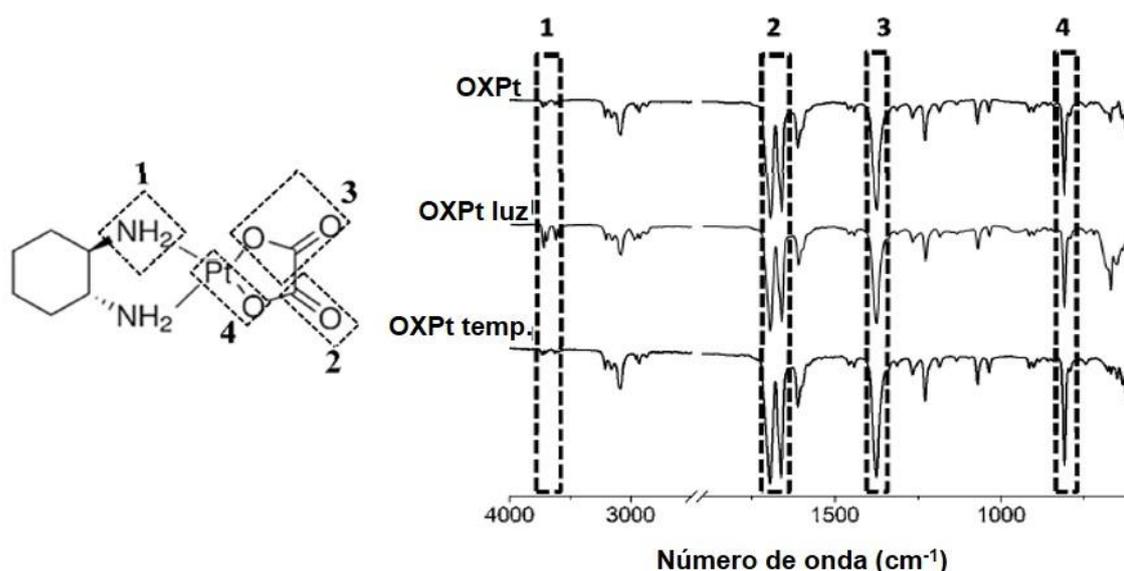


Figura 3.1. Caracterização molecular da OXPt não tratada e após exposição à luz e temperatura. As áreas pontilhadas indicam os principais grupos funcionais da molécula de OXPt obtidas através de FTIR.

O perfil térmico da OXPt pode ser observado na Figura 3.2. Termograma da OXPt indica que o fármaco sofre decomposição em 282 °C. Além disso, o perfil térmico do fármaco que sofreu exposição à luz permaneceu inalterado.

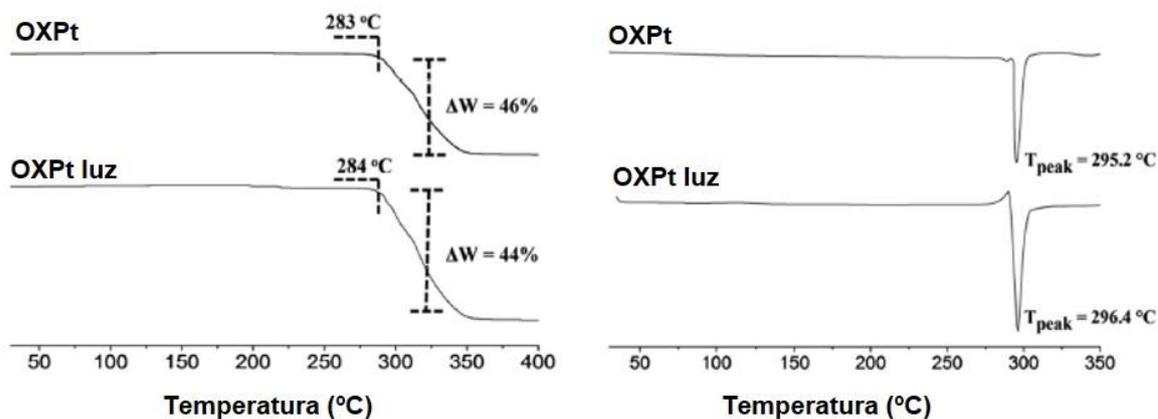


Figura 3.2. Caracterização térmica (TGA e DSC) da OXPt não tratada e após exposição à luz e temperatura.

O padrão de XRPD da OXPt após aquecimento não sofreu alteração (Figura 3.3). No entanto, OXPt exposta à luz mostrou variações nas intensidades relativas dos picos. Estas alterações podem estar relacionadas à orientação do cristal no teste, sem nenhuma relação com mudanças físicas na amostra. Os cristais de OXPt incolores e multifacetados não sofreram nenhuma mudança aparente no hábito cristalino após os tratamentos com luz ou calor (Figura 3.3). Os resultados físico-químicos juntos mostram uma evidência consistente na estabilidade da OXPt no estado sólido, operando em condições normais de processamento farmacêutico.

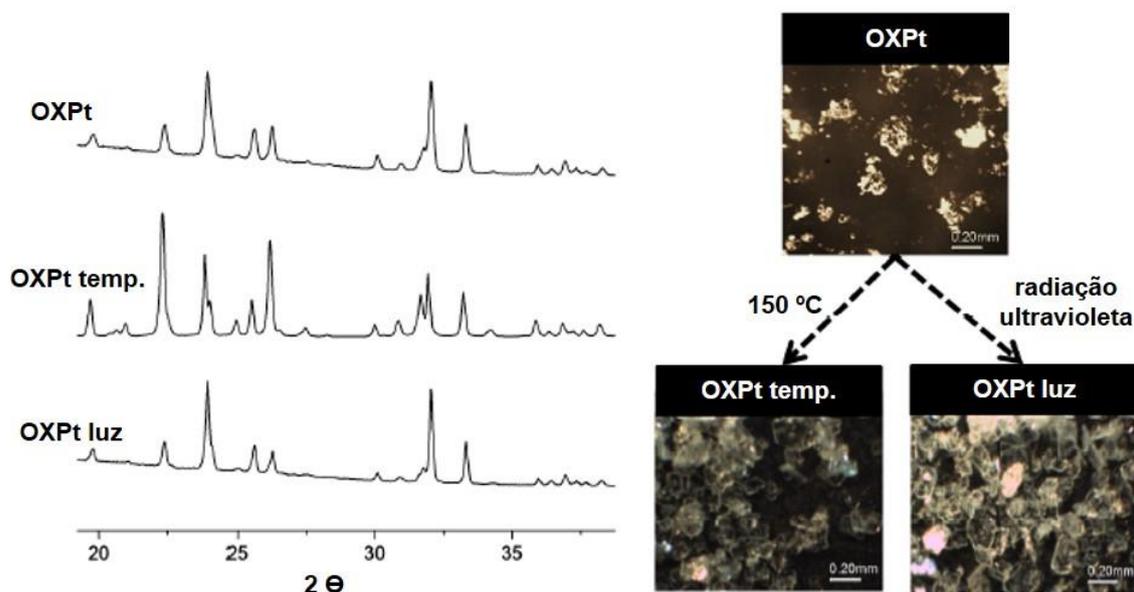


Figura 3.3. Caracterização cristalográfica e morfológica da OXPt não tratada e após exposição à luz e temperatura.

Resultados conflitantes podem ser observados comparando dados térmicos e difratométricos da OXPt já publicados na literatura. Sobre o comportamento térmico da OXPt, existem dados na literatura com o ponto de fusão da molécula em 248 e 260° C^{18,19}. Os resultados indicaram um único evento térmico, a decomposição da OXPt a partir de 282° C, com perda de peso de aproximadamente 46% (Figura 3.2). Qiu, L. *et al.* (2012)²⁰ publicou um resultado similar mostrando a degradação do fármaco inicialmente a 260° C²⁰. Zhang, D. *et al.* (2016)²¹ encontrou a fusão da OXPt a 317° C seguido da temperatura de decomposição a 322° C²¹.

Similarmente, perfis de XRPD da OXPt já publicados na literatura apresentam diferenças nas posições e intensidades dos picos. Enquanto a OXPt usada nestes ensaios mostrou um perfil cristalino com picos de alta intensidade em 22,4, 24,0, 25,6, 26,3, 32,0 e 33,3 ° 2 θ , outros artigos descreveram picos de alta intensidade para este fármaco em 7,0, 7,8, 14, 16 e 21 ° 2 θ ^{19,20}.

É importante ressaltar que as diferenças apresentadas pelas análises térmicas e de difração da OXPt podem ser relatadas pelo grau de contaminação da amostra do fármaco que, apesar de estar em acordo com a farmacopeia, pode variar com a mudança de fornecedor, por exemplo, e interferir em tais análises.

3.2.3 Ensaio de compatibilidade

A compatibilidade entre OXPt e alguns polímeros com relevância farmacêutica foi avaliada pela primeira vez utilizando diferentes ferramentas analíticas. Os estresses de temperatura e luz também foram utilizados nas misturas binárias de OXPt e polímeros, com o objetivo de aumentar o grau de interação entre os componentes e facilitar a detecção de possíveis incompatibilidades²².

a) DSC

Os resultados de DSC da OXPt e suas misturas binárias com QBPM, QMPM e PLGA mostraram picos de desidratação e/ou decomposição com apenas um evento entálpico por análise. Nesses casos, a ausência de outros eventos térmicos bem definidos, como o ponto de fusão, dificulta conclusões definitivas sobre a estabilidade das amostras. No entanto, misturas contendo POLOX, que possui ponto de fusão definido em aproximadamente 57° C, permitiu uma avaliação mais precisa. Na mistura OXPt/POLOX, o pico referente ao ponto de fusão do polímero sofreu pequenas alterações que variaram na faixa de 55 a 57° C, mesmo quando as amostras foram expostas previamente às condições de estresses, o que está de acordo com outros dados relatados na literatura^{23,24}.

b) DTG

Os resultados das análises termogravimétricas estão apresentados na Figura 3.4. O POLOX iniciou sua decomposição em aproximadamente 180° C e a presença do fármaco em contato com o polímero aumentou a resistência térmica do sistema. A decomposição térmica da mistura OXPt/POLOX ocorreu a partir de 285° C, sendo igual à temperatura inicial de decomposição da OXPt. Comportamento similar ocorreu com a mistura OXPt/PLGA, que também mostrou decomposição inicial a partir de 285° C.

As misturas de OXPt com os polímeros QBPM e QMPM apresentaram resistência térmica mais baixa do que aquelas contendo POLOX e PLGA (Figura 4.4). A decomposição térmica da mistura OXPt/QBPM e OXPt/QMPM ocorreu a partir de 269 e 264° C, respectivamente. Estas amostras tiveram a estabilidade reduzida quando expostas à luz, principalmente a mistura de OXPt/QMPM,

mostrando uma redução da temperatura de decomposição inicial em aproximadamente 8° C (Figura 3.4).

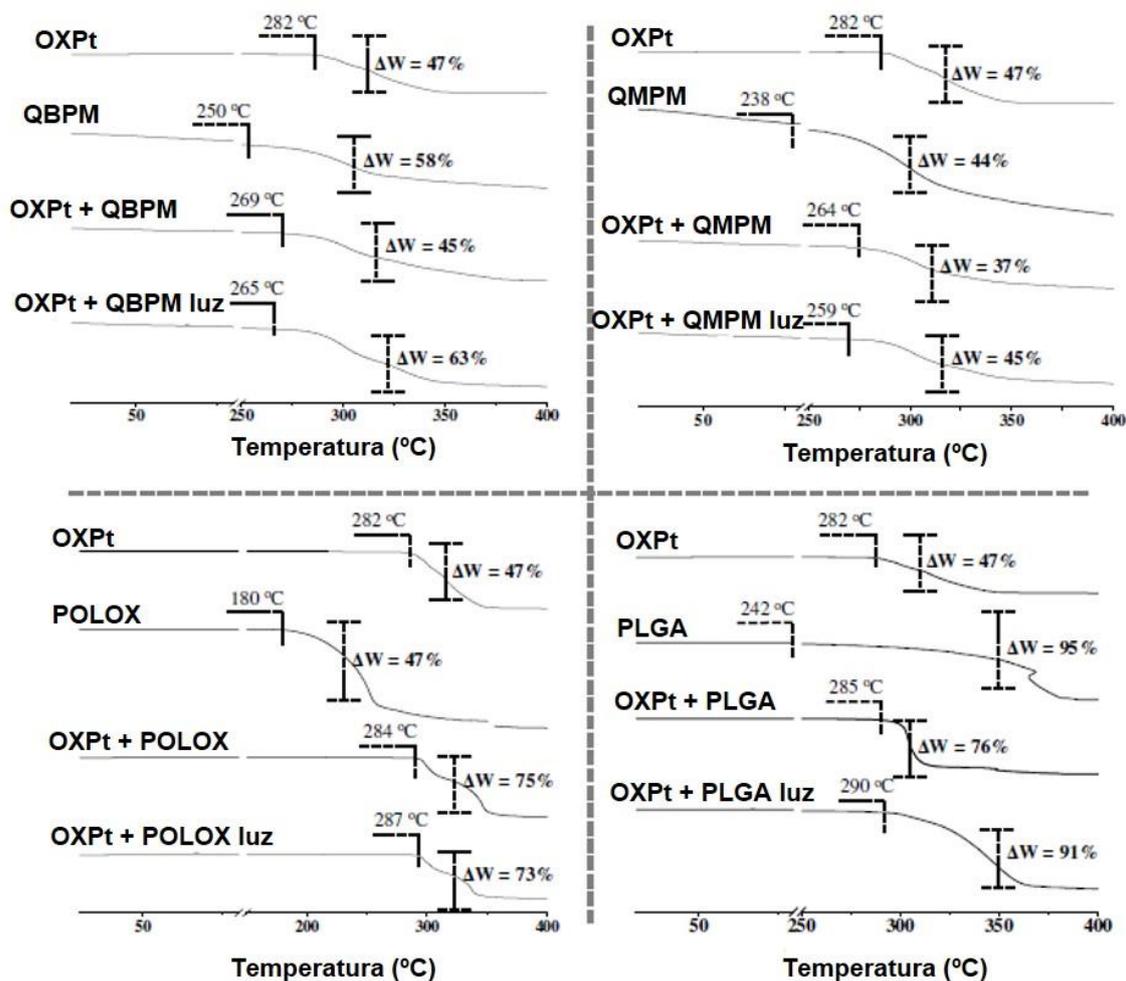


Figura 3.4. Resultados termogravimétricos da OXPt, polímeros (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) e suas misturas binárias. ΔW = perda de massa da amostra.

Além disso, foram realizados estudos de termogravimetria isotérmica para determinar o impacto à estabilidade do sistema de OXPt com quitosanas através da energia de ativação dessas amostras sólidas. As energias de ativação das QBPM, QMPM foram de $101,26 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $112,20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Valores de $145,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $156,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente, são relatados na literatura^{25,26}. As diferenças nas energias de ativação das quitosanas podem ser explicadas pelas diferenças no grau de desacetilação e tamanho das cadeias poliméricas²⁷.

A presença de OXPt modificou o perfil de decomposição do polímero no sistema binário, confirmando os resultados das análises termogravimétricas. As energias de ativação encontradas para OXPt/QBPM e OXPt/QMPM foram de 208,7

$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $174,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. É importante ressaltar o aumento em 100% do valor da energia de ativação na mistura contendo QBPM. Para os sistemas binários com quitosana, ao contrário do que acontece com os polímeros sozinhos, a mistura binária com QMPM tem menos estabilidade do que o sistema com QBPM. Assim, os resultados térmicos sugerem uma perda de estabilidade da OXPt nos sistemas contendo QMPM.

c) FTIR

O espectro de infravermelho da OXPt, dos polímeros selecionados e suas misturas binárias estão apresentados na Figura 3.5. Não existem alterações nas bandas correspondentes aos grupos funcionais da OXPt na mistura binária com POLOX, incluindo as amostras submetidas ao calor e à luz. Portanto, não há evidências de alterações químicas do fármaco na presença deste polímero. A mesma conclusão pode ser obtida para os polímeros QBPM e PLGA (Figura 3.5).

As amostras de OXPt/PLGA apresentaram algumas oscilações na região de $1200\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$, relativas ao sinal espectroscópico do polímero (Figura 3.5). No entanto, todas as bandas correspondentes aos grupos funcionais da OXPt foram identificadas nesta amostra, sem nenhuma alteração de posição. A falta de uniformidade nas misturas pode ocasionar algumas diferenças de intensidade nas bandas em comparação com a mistura física, o que explica o espectro obtido para a amostra de OXPt/PLGA submetida à luz.

Em contraste aos resultados apresentados para os demais polímeros, a mistura contendo QMPM quando exposta à luz e ao calor (Figura 3.5) sofreu alterações significativas em várias bandas do fármaco, relacionadas aos grupos carbonila (1696 e 1662 cm^{-1}), grupos éster (1611 e 1368 cm^{-1}) e ligação Pt-O (808 cm^{-1}). A QMPM possui um número de grupos amino e grupos hidroxila maior do que a QBPM, apresentando um maior potencial para reações químicas²⁸. Os dados obtidos para FTIR produziram evidências consistentes da decomposição da OXPt na mistura binária com quitosana de médio peso molecular.

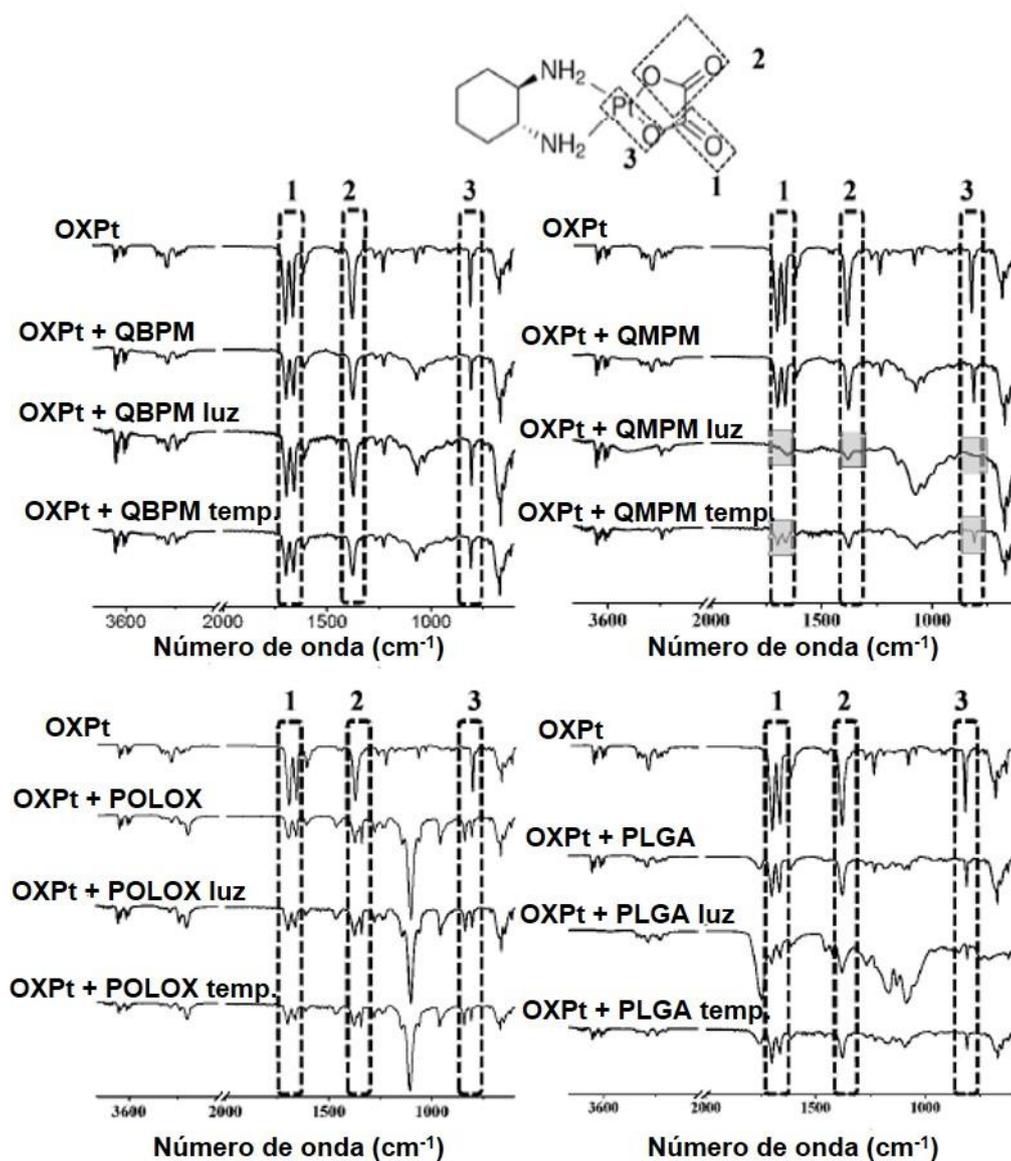


Figura 3.5. Resultados de FTIR da OXPt, polímeros (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) e suas misturas binárias. As áreas pontilhadas indicam os principais grupos funcionais da molécula de OXPt e as áreas cinza indicam as regiões do espectro com alterações significativas.

d) XRPD e Microscopia ótica

A estabilidade física das misturas binárias foi avaliada usando XRPD e microscopia ótica (Figura 3.6 e Figura 3.7, respectivamente).

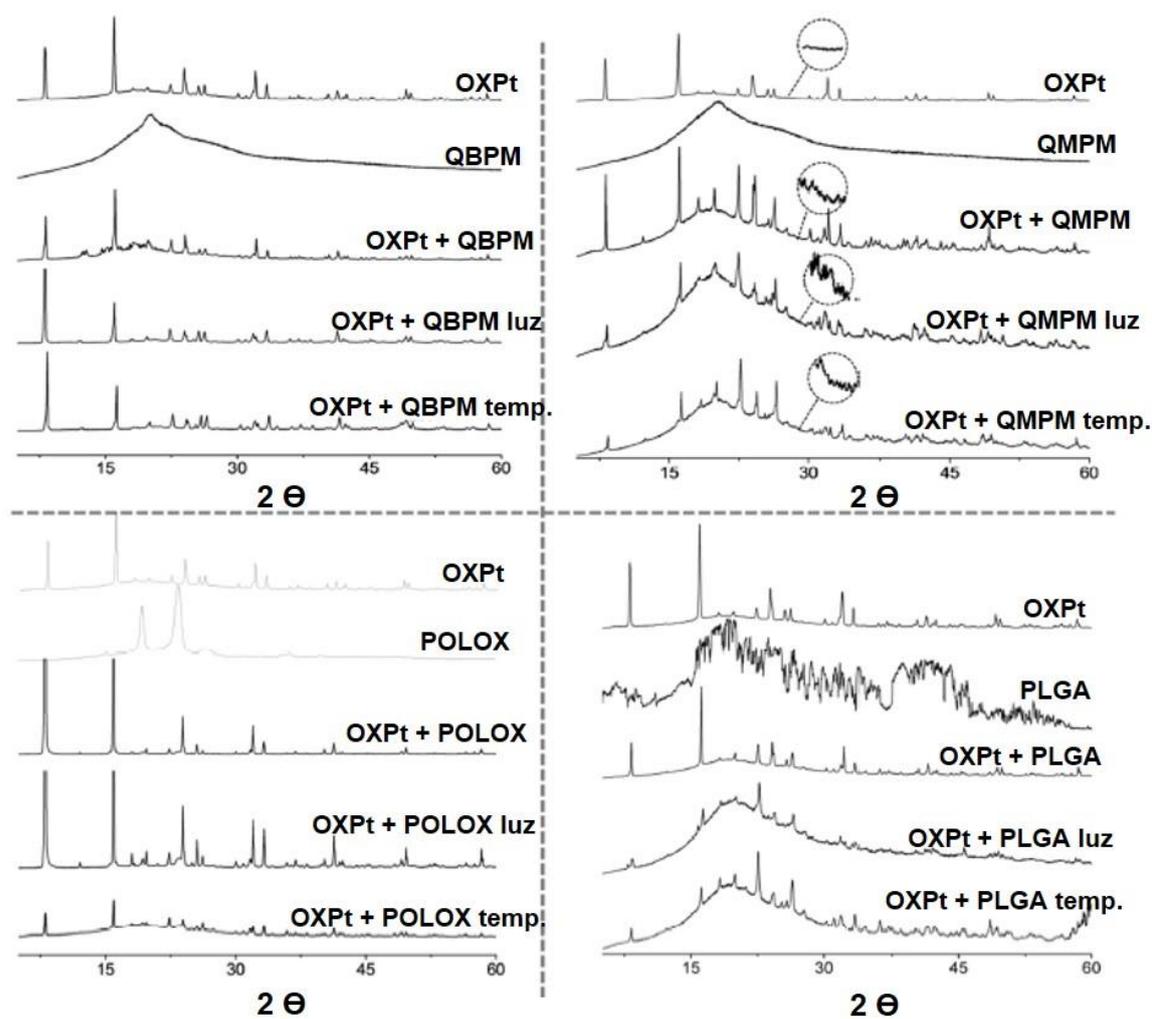


Figura 3.6. Resultados de XRPD da OXPt, polímeros (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) e suas misturas binárias. Em destaque, o aumento da linha de base referente às análises do polímero QMPM.

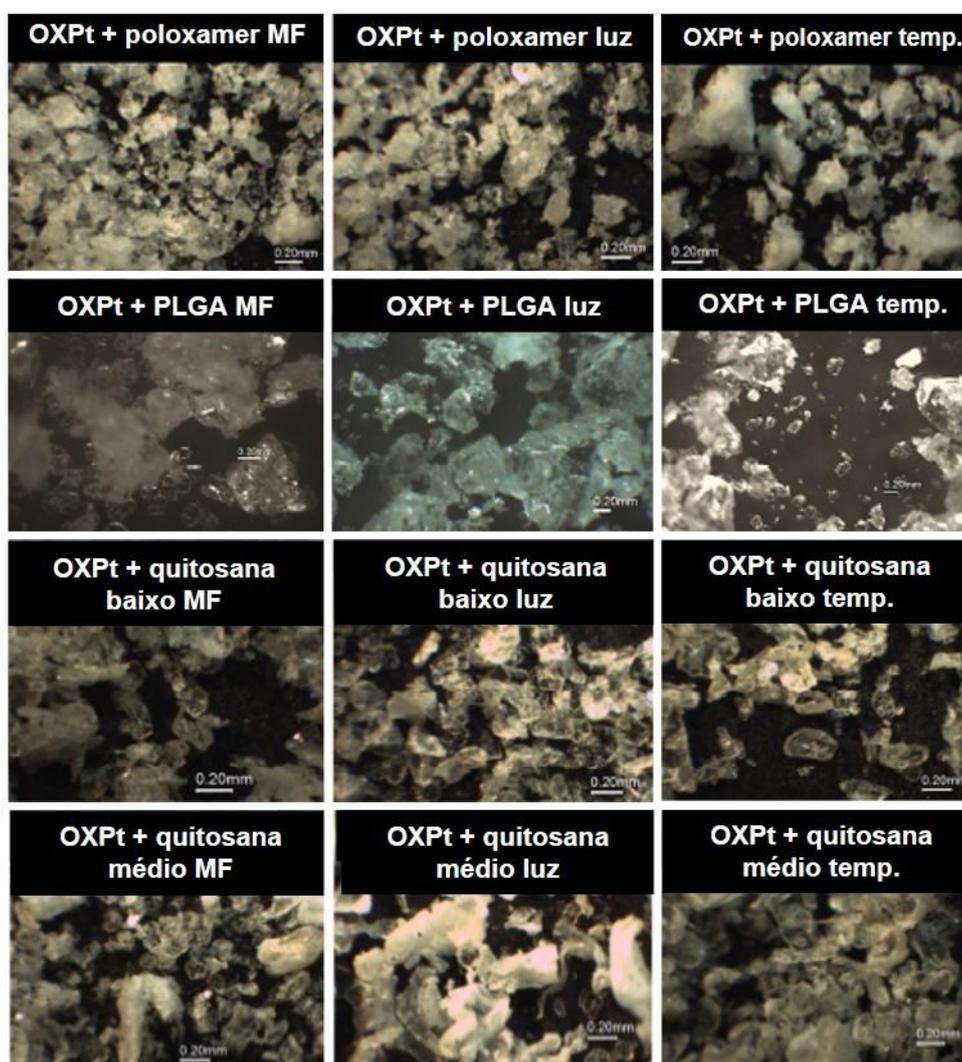


Figura 3.7. Microscopia óptica das misturas binárias entre OXPt e polímeros (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) com amostras sem tratamento e após a exposição à luz e temperatura.

Nas misturas contendo POLOX, a fotomicrografia revelou uma alta aglomeração das partículas na mistura aquecida, provavelmente devido à fusão e consequente solidificação do polímero (Figura 3.7). Para as misturas contendo este polímero, o perfil difratométrico do fármaco permaneceu inalterado, exceto pela amostra aquecida, que apresentou claramente a presença de componentes amorfos (Figura 3.6). A análise do perfil difratométrico do POLOX submetido à tratamento térmico mostra que este componente tornou-se amorfo após a sua fusão-solidificação, o que pode explicar o perfil encontrado na amostra de OXPt/POLOX aquecida.

No caso da mistura binária de OXPt/PLGA, foi observado que os tratamentos térmicos e de luz nas amostras exibiu um intenso componente amorfo não observado na mistura física inicial (Figura 3.6). Este efeito pode ser causado pela falta de uniformidade da mistura ou por algumas mudanças físicas após aquecimento e exposição à luz das amostras. O componente cristalino dessas misturas coincidem com o perfil cristalográfico original da OXPt, descartando uma possível alteração física do fármaco. A aparência microscópica das amostras não mostrou nenhuma mudança estrutural em comparação com as amostras não tratadas, concluindo-se que não há comprometimento da estabilidade da OXPt (Figura 3.7).

Nos difratogramas das misturas contendo QBPM, é possível identificar os principais picos correspondentes ao perfil original do cristal de OXPt, assim como a existência de um componente amorfo correspondente ao polímero (Figura 3.6). O mesmo perfil é encontrado para as amostras estressadas (temperatura e luz). Similarmente, não existem sinais de mudanças físicas na amostra de OXPt/QBPM nas imagens óticas (Figura 3.7).

Variações nas intensidades relativas dos picos correspondendo ao cristal original de OXPt foram observadas nos padrões das amostras de QMPM submetidas à temperatura e luz. Além disso, os componentes amorfos dessas amostras podem ser visualizados mais facilmente pelas de base mais irregulares, principalmente da amostra de OXPt/QMPM submetida à luz (Figura 3.6). Estas alterações são sutis e podem estar relacionadas à orientação preferencial do cristal e a problemas de uniformidade da mistura. Assim, a possibilidade de decomposição dessas misturas após o tratamento, com a produção de produtos de degradação amorfos, não pode ser descartada. A mistura binária de OXPt/QMPM, após exposição à luz, mostrou uma aparência física mais opaca (Figura 3.7).

A Tabela 3.1 sintetiza as principais conclusões deste estudo de compatibilidade considerando-se os diferentes testes. Pode-se concluir que os polímeros QBPM, PLGA e POLOX são quimicamente compatíveis com a OXPt e, conseqüentemente, são indicados para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificados contendo este fármaco. Por outro lado, o polímero QMPM provou por diferentes testes o potencial em comprometer a estabilidade física e química da OXPt e, por conseguinte, deve ser evitado nas preparações

farmacêuticas.

Tabela 3.1. Resumo das evidências de (in)compatibilidade entre OXPt e os polímeros selecionados (QBPM, QMPM, POLOX e PLGA) após ensaios de DSC, TGA, FTIR, Microscopia ótica e XRPD.

	Evidências de incompatibilidade			
	QBPM	QMPM	POLOX	PLGA
DSC	∅	∅	∅	∅
TGA	∅	+	∅	∅
FTIR	∅	++	∅	∅
MO	∅	+	∅	∅
XRPD	∅	+	∅	+
Disposição final	compatível	Incompatível	compatível	compatível

∅ = nenhuma evidência; + = evidência fraca; ++ = evidência forte

3.3 Conclusão

Os estudos descritos nesta etapa do trabalho forneceram informações importantes para auxiliar no desenvolvimento de sistemas farmacêuticos inovadores contendo OXPt. A determinação da solubilidade e log P do fármaco permitiu classificar a OXPt como classe III seguindo a SCB. Estudos térmicos juntamente com estudos de caracterização físico-química mostraram que a OXPt é estável em condições normais de produção farmacêutica que envolvem aquecimento e incidência de luz. Além disso, o fármaco mostrou-se compatível com os polímeros QBPM, POLOX e PLGA, que são relevantes para a produção de matrizes de sistemas de liberação modificada. Somente a QMPM mostrou evidências consistentes no comprometimento da estabilidade física e química da OXPt e, portanto, a sua utilização em formulações farmacêuticas com este fármaco deve ser evitada.

3.4 Referências

1. Moehler, M.; Mahlberg, R.; Heinemann, V.; Obermannová, R.; Kubala, E.; Melichar, B.; Weinmann, A.; Scigalla, P.; Tesařová, M.; Janda, P.; Hédouin-Biville, F.; Mansoor, W. Phase I study of orally administered S-1 in combination with epirubicin and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors and chemotherapy-

naïve advanced or metastatic esophagogastric cancer, *Gastric Cancer*, In press, 2016.

2. Jordan, B.; Jahn, F.; Beckmann, J.; Unverzagt, S.; Müller-Tidow, C.; Jordan, K. Calcium and magnesium infusions for the prevention of oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: a systematic review, *Oncology*, In press, 2016.

3. Beijers, A. J.; Mols, F.; Vreugdenhil, G. A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration, *Support Care Cancer*. v.22, p.1999-2007, 2014.

4. Lopez, R. F.; Lange, N.; Guy, R.; Bentley, M. V. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters, *Advance in Drug Delivery Review*. v.56, p.77-94, 2004.

5. Gelfuso, G. M.; Gratieri, T.; Souza, J. G.; Thomazine, J. A.; Lopez, R. F. The influence of positive or negative charges in the passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy, *European Journal of. Pharmaceutics and. Biopharmaceutics*. v.77, p.249-256, 2011.

6. Gratieri, T.; Kalia, Y. N. Targeted local simultaneous iontophoresis of chemotherapeutics for topical therapy of head and neck cancers, *International Journal of Pharmaceutics*. v.460, p. 24-27, 2014.

7. Araki, T.; Ogawara, K.; Suzuki, H.; Kawai, R.; Watanabe, T.; Ono, T.; Higaki, K. Augmented EPR effect by photo-triggered tumor vascular treatment improved therapeutic efficacy of liposomal paclitaxel in mice bearing tumors with low permeable vasculature, *Journal of. Control Release*. v. 200, p.106-114, 2015.

8. Dorrani, M.; Garbuzenko, O. B.; Minko, T.; Michniak-Kohn, B. Development of edge-activated liposomes for siRNA delivery to human basal epidermis for melanoma therapy, *Journal of Control Release*. v. 228, p.150-158, 2016.

9. Abrantes, C. G.; Duarte, D.; Reis, C. P. An overview of pharmaceutical excipients: safe or not safe? *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. S0022-3549, p.00447-0, 2016

10. Matos, B. N.; Oliveira, P.M.; Reis, T.A.; Gratieri, T.; Cunha-Filho, M.; Gelfuso, G. M. Development and validation of a simple and selective analytical HPLC method for the quantification of oxaliplatin. *Journal of Chemistry*. v.2015, p.1-6, 2015.
11. ICH, "Q1B, Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products," in *Proceedings of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Geneva, Switzerland, 2005.
12. Talvani, A.; Bahia, M .T.; Sá-Barreto, L.C.L; Lima, E. M; Cunha-Filho, M.S.S. Carvedilol: decomposition kinetics and compatibility with pharmaceutical excipients, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v.115, p. 2501-2506, 2014.
13. FDA - US Food and Drug Administration, "Draft guidance for industry, waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system". Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070246.pdf>, 2015. Acesso em 07/06/2016.
14. Franzen, U.; Nguyen, T. T.; Vermehren, C.; Gammelgaard, B.; Ostergaard, J. Characterization of a liposome-based formulation of oxaliplatin using capillary electrophoresis: encapsulation and leakage. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis*. v.55, p.16-22, 2011.
15. Dahan, A.; Miller, J. M.; Gordon, L. Amidon. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs, *AAPS J.* 11 p.740–746, 2009.
16. Screnci, D.; Mckeage, M. J.; Galettis, P.; Hambley, T. W.; Palmer, B.D.; Baguley, B.C. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs, *British Journal of Cancer*. v.82, p.966-972, 2000.
17. Kasim, N. A.; Whitehouse, M.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Lennernas, H.; Hussain, A.S; Junginger, H.E.; Stavchansky, S.A.; Midha, K.; Shah, V.P.; Amidon, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification, *Molecular Pharmaceutics*. v.1, p.85-96, 2004.

18. Jain, A.; Jain, S.K.; Ganesh, N.; Barve, J.; Beg, A.M. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer, *Nanomedicine*. v.6, p.179-190, 2010.
19. Tummala, S.; Gowthamarajan, K.; Satish Kumar, M.N.; Praveen, T.K.; Yamjala, K. Tripuraneni, N.S; Prakash, A. Formulation and optimization of oxaliplatin immuno-nanoparticles using Box-Behnken design and cytotoxicity assessment for synergistic and receptor-mediated targeting in the treatment of colorectal cancer, *Artificial Cells, Nanomedicine Biotechnology*. p.1-16, 2015.
20. Qiu, L.; Yang, L.; Zhou, H.; Long, M.; Jiang, W.; Wang, D.; Zhang, X. Encapsulation of oxaliplatin in nanostructured lipid carriers - preparation, physicochemical characterization and in vitro evaluation, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.7, p.352–358, 2012.
21. Zhang, D.; Zhang, J.; Jiang, K.; Li, K.; Cong, Y.; Pu, S.; Jin, Y; Lin, J. Preparation, characterisation and antitumour activity of β -, γ - and HP- β -cyclodextrin inclusion complexes of oxaliplatin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. v.152, p.501-508, 2016.
22. Alves-Silva, I.; Sá-Barreto, L.C.L; Lima, E.M.; Cunha-Filho, M.S.S. Preformulation studies of itraconazole associated with benznidazole and pharmaceutical excipients, *Thermochimica Acta*. v.575, p.29–33, 2014.
23. Kweon, H.Y.; Yoo, M.K.; Lee, J.H.; Wee, W.R.; Han, Y.G.; Lee, K.G; Cho, C.S. Preparation of a novel poloxamer hydrogel, *Journal of Applied Polymer Science* v.88, p. 2670-2676, 2003.
24. Albertini, B.; Passerini, M.; Di Sabatino, M.; Monti, D.; Burgalassi, S.; Chetoni, P.; Rodriguez, L. Poloxamer 407 microspheres for ototransmucosal drug delivery. Part I: Formulation, manufacturing and characterization, *International Journal of Pharmaceutics*. v.399, p.71-79, 2010.
25. Qu, X.; Wirsén, A. Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivatives. *Polymer*. v.41, p.4841-4847, 2000.

26. Britto, D.; Campana-Filho, S. P A kinetic study on the thermal degradation of N,N,N-trimethylchitosan, *Polym. Degrad. Stab.* v.84, p.353–361, 2004.
27. Britto, D.; Campana-Filho, S. P. Kinetics of the thermal degradation of chitosan, *Thermochimica Acta*, v.465, p.73-82, 2007.

CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO OXALIPLATINA PARA TRATAMENTO TÓPICO DE CÂNCER DA CAVIDADE ORAL

Esta etapa do trabalho apresenta dados de desenvolvimento da formulação, incluindo obtenção otimizada de nanopartículas de quitosana com potencial zeta positivo, caracterização dos sistemas obtidos, avaliação preliminar de sua estabilidade, verificação da mucoadesividade das partículas, determinação dos perfis de liberação e permeação da OXPt através da mucosa com e sem a utilização da iontoforese, bem como a avaliação *in vitro* da atividade da formulação frente a células de tumores de língua.

4.1 Material e Métodos

4.1.1 Material

A OXPt (platinum(4+) ion (1R,2R)-cyclohexane-1,2-diaminide oxalate, $C_8H_{12}N_2O_4Pt$, 99.0%) utilizada neste trabalho foi adquirida da Simagchem Co. (Xiamen, China). O polímero (QBPM) (PM = 50,000-190,000 Da e grau de desacetilação 75-85%), ácido acético 99,9%, tripolifosfato de sódio (TPP), a mucina tipo III e o sal HEPES foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Cloreto de sódio (NaCl) (Serva, Rio de Janeiro, Brasil). A membrana hidrofílica de acetato de celulose utilizada nos experimentos de liberação (Dialysis Tubing MWCO 12000-14000, Fisherbrand) foi obtida da Fisher Cientific (Reino Unido). Acetonitrila e metanol grau HPLC foram adquiridos da J.T. Barker (Pensilvânia, EUA). HEPES – Sal sódico (ultrapuro) para preparo de tampão também foi adquirido da J. T. Baker (Pensilvânia, EUA). Nos ensaios de viabilidade celular, a linhagem celular de câncer de língua humana (SCC-9) foi adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC). O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) F12 foi obtido da empresa Gibco (Estados Unidos). O Brometo de 3(4,5dimetiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) foi obtido da empresa Invitrogen (Estados Unidos). Ainda, foram utilizados dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EUA) e o tampão fosfato salino PBS (Laborclin, São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas com água Mili-Q (Milipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

4.1.2. Obtenção da mucosa oral suína

A mucosa oral de suínos foi gentilmente cedida pelo frigorífico Bonasa (São Sebastião, Distrito Federal). Os fragmentos de mucosas foram obtidos logo após o abate e antes do processo de escalda do animal, e foram transportadas para o laboratório sob refrigeração, sendo constantemente umedecidas com tampão HEPES 0,01M pH 7,4 durante o transporte. As mucosas foram delicadamente separadas da bochecha do porco e mantidas hidratadas até a realização dos experimentos, que ocorreu no mesmo dia do abate (Figura 4.1).

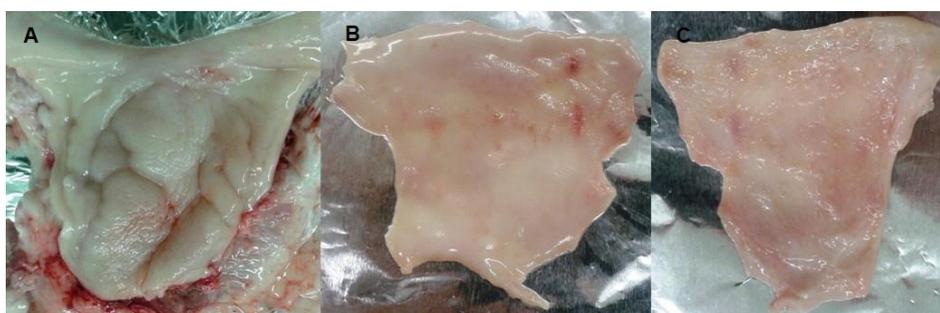


Figura 4.1. Processo de retirada da mucosa oral da bochecha de suínos. A) Mucosa oral de suíno obtida logo após o abate, B) Mucosa oral limpa e separada da bochecha (lado superior) e C) Parte interna da mucosa oral suína³².

4.1.3 Desenho experimental para otimização no preparo das nanopartículas

As nanopartículas foram obtidas a partir da técnica de geleificação ionotrópica¹. Resumidamente, soluções aquosas de quitosana contendo ácido acético foram preparadas e mantidas sob agitação, *overnight*. Sob estas soluções foram gotejadas soluções do agente reticulante, o TPP. A reticulação do polímero positivo pelo TPP negativo proporciona a formação das nanopartículas de quitosana (NP).

Assim, a técnica foi otimizada variando parâmetros críticos do processo a partir da construção de um desenho experimental ³³ (Tabela 4.1). As três variáveis estudadas foram: i) pH da solução inicial de quitosana, ii) concentração da solução de quitosana e iii) concentração da solução de TPP. Foram testadas três condições diferentes para cada parâmetro escolhido: para o pH foram testados os valores de 3,5; 4,5 e 5,5; para a concentração de quitosana foram selecionados os valores de 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para a concentração de TPP foram testados os valores de 0,5; 1,0; 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os outros parâmetros foram mantidos constantes durante todo

o estudo: a velocidade de agitação foi mantida a 1000 rpm, concentração de ácido acético a 1% (v/v) e proporção polímero/TPP 5:2 (v/v). As principais respostas analisadas a partir desse desenho experimental foram: i) diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, ii) potencial zeta e iii) índice de polidispersão (PDI).

Tabela 4.1. Desenho experimental para obtenção de nanopartículas de quitosana (NP)

Teste	Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas		
	pH	[Quitosana]	[TPP]	pH	[Quitosana]	[TPP]
F1	-1	-1	-1	3,5	1,0	0,5
F2	0	-1	-1	4,5	1,0	0,5
F3	1	-1	-1	5,5	1,0	0,5
F4	-1	0	-1	3,5	1,5	0,5
F5	0	0	-1	4,5	1,5	0,5
F6	1	0	-1	5,5	1,5	0,5
F7	-1	1	-1	3,5	2,0	0,5
F8	0	1	-1	4,5	2,0	0,5
F9	1	1	-1	5,5	2,0	0,5
F10	-1	-1	0	3,5	1,0	1,0
F11	0	-1	0	4,5	1,0	1,0
F12	1	-1	0	5,5	1,0	1,0
F13	-1	0	0	3,5	1,5	1,0
F14	0	0	0	4,5	1,5	1,0
F15	1	0	0	5,5	1,5	1,0
F16	-1	1	0	3,5	2,0	1,0
F17	0	1	0	4,5	2,0	1,0
F18	1	1	0	5,5	2,0	1,0
F19	-1	-1	1	3,5	1,0	1,5
F20	0	-1	1	4,5	1,0	1,5
F21	1	-1	1	5,5	1,0	1,5
F22	-1	0	1	3,5	1,5	1,5
F23	0	0	1	4,5	1,5	1,5
F24	1	0	1	5,5	1,5	1,5
F25	-1	1	1	3,5	2,0	1,5
F26	0	1	1	4,5	2,0	1,5
F27	1	1	1	5,5	2,0	1,5

Para a nanoencapsulação da OXPt, foram utilizadas a combinação dos valores do desenho experimental que obtiveram o menor tamanho de partículas, potencial zeta acima de +30 mV e valor de PDI adequado (abaixo de 0,5).

A partir das nanopartículas otimizadas, foram testadas três proporções de polímero/fármaco - 1:1; 2:1; 4:1 (m/m) - para se estabelecer qual proporção

possuiria a maior eficiência de encapsulação. As quantidades testadas estão descritas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Quantidade de fármaco (OXPt) e polímero (quitosana) por 7 mL de solução utilizados na obtenção das nanopartículas.

Amostra	Quantidade de quitosana (mg)	Quantidade de OXPt (mg)	Proporção polímero/fármaco
NP-OXPT 1	10,5	10,5	1:1
NP-OXPT 2	10,5	5,25	2:1
NP-OXPT 3	10,5	2,625	4:1

4.1.4 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram caracterizadas de acordo com a distribuição do tamanho da partícula (diâmetro hidrodinâmico e PDI), potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação do fármaco, conforme metodologias descritas abaixo. Os dados para caracterização das partículas foram analisados no software *Design-Expert*[®]. Foram avaliadas as principais interações significativas para a obtenção das partículas com menor tamanho, potencial zeta acima de + 30 mV e PDI adequado ($p < 0,0001$).

a) Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico das partículas e o potencial zeta foram analisados por espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética, respectivamente. 1 mL da suspensão coloidal das nanopartículas foram analisadas logo após sua obtenção em um aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA). Para análise do potencial zeta foram acrescentados o equivalente à 10 mM de NaCl à suspensão coloidal de partículas, para garantir a condutividade adequada para a correta leitura das amostras².

b) Morfologia

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a análise, uma gota de cada uma das amostras de nanopartículas contendo o fármaco foi colocadas em suportes metálicos e deixadas à temperatura ambiente até a evaporação completa do solvente. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em um MEV (Quanta FEG 250 FEI, EUA) em aumento de 10.000 a 40.000 vezes.

c) Eficiência de Encapsulação por centrifugação em Vivaspin

A eficiência de encapsulação foi determinada por centrifugação da suspensão das nanopartículas em um dispositivo com tamanho de poro definido em 10kDa (Vivaspin 2, 100000, MWCO HY, Sartorio, Goettingen, Alemanha) (Figura 4.2). A amostra foi centrifugada por 30 minutos à 4000 rpm em uma centrífuga (Nova Ética, Brasil), sendo o filtrado constituído de OXPt livre (FL).



Figura 4.2. Representação do protocolo de eficiência de encapsulação por Vivaspin³³.

A concentração de OXPt encapsulada foi determinada pela diferença entre a concentração inicial de fármaco adicionado (FT) e a concentração de OXPt não encapsulada obtida (FL). A eficiência de encapsulação, então, foi calculada da seguinte forma:

$$EE\% = (FT - FL) / FT \times 100 \quad (6),$$

Onde: EE% é a eficiência de encapsulação de OXPt na nanopartícula; FL é a concentração de OXPt que não foi encapsulado nas nanopartículas de quitosana;

e FT é a concentração de OXPt que foi inicialmente colocada para preparo das nanopartículas.

4.1.5 Estabilidade físico-química das NP-OXPt

A estabilidade físico-química das nanopartículas foi determinada pela análise da suspensão das NP (nanopartículas de quitosana controle sem o fármaco) e NP-OXPt nos dias 0, 1, 3, 7, 15, 30 e 60, armazenadas em quadruplicata para cada formulação nas temperaturas $25^{\circ}\text{C} \pm 3,0$ e $10^{\circ}\text{C} \pm 2,0$. As análises foram realizadas no aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA), observando possíveis alterações no diâmetro hidrodinâmico médio de partículas, PDI e potencial zeta. Para as NP-OXPt foi avaliado o teor de fármaco encapsulado em um método analítico de CLAE (Capítulo 2).

*4.1.6 Estudos *in vitro* de liberação da OXPt a partir das NP-OXPt*

A influência das NP-OXPt desenvolvidas na velocidade de liberação da OXPt foi verificada *in vitro* por meio de um ensaio de liberação. Este ensaio foi realizado utilizando-se células de difusão do tipo Franz modificada e membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose.

A solução presente no compartimento receptor da célula foi uma solução tampão HEPES, pH 7,4, mantida a 32°C durante todo o tempo de experimento. Essa solução foi sendo reposta ao compartimento receptor à medida que, de 1 h em 1h, foram coletadas para análise de 1 mL de solução receptora ao longo de 6 h de experimento. No compartimento doador foi adicionado 1 mL da NP-OXPt. Como controle, ou seja, para eliminar o efeito da membrana no controle da liberação do fármaco, um experimento semelhantes foi realizado colocando-se no compartimento doador 1 mL de uma solução aquosa do fármaco. Todas as formulações (controle e NP-OXPt) continham 1,5 % (m/m) de OXPt e tiveram seu pH corrigido para 5,5. O experimento foi realizado em quintuplicata para cada formulação. A quantidade de fármaco liberada foi determinada por meio do método analítico previamente validado (Capítulo 2). O perfil de liberação da OXPt a partir da NP-OPXt foi analisado e comparado com a solução aquosa do fármaco por meio

de métodos gráficos relacionando-se a quantidade de fármaco liberada (μg) em função do tempo (h).

Para se determinar a quantidade de fármaco liberado que se difunde através da membrana hidrofílica foi necessário realizar um cálculo de acordo com a seguinte equação:

$$Q_{\text{realt}} = C_{\text{mensurado}} \times V_r + V_a \times \sum^{n-1} C_a \quad (8),$$

Onde: Q_{realt} é a quantidade liberada acumulada de fármaco no tempo t ; $C_{\text{mensurado}}$ é a concentração mensurada do fármaco da coleta no tempo t ; V_r é o volume do compartimento receptor da célula de difusão; V_a é o volume de amostra removido na coleta; e C_a é a concentração de fármaco na amostra removida.

4.1.7 Avaliação *in vitro* da mucoadesividade das NP-OXPt

a) Preparo das partículas de mucina

Mucina suína do tipo III foi hidratada em água Milli-Q, à temperatura de 4°C , *overnight*, na proporção de 1:10 (m/v) e, posteriormente, teve o pH ajustado para 7,4 com solução de NaOH 1,0 M. A solução foi diluída em tampão HEPES, pH 7,4, a uma concentração final de mucina igual à 1% (m/v). A solução diluída foi sonicada em um sonicador de ponta (Sonics, EUA) até que as partículas de mucina atingissem diâmetro hidrodinâmico menor que 700 nm. As análises referentes ao tamanho das partículas foram realizadas em triplicata no aparelho Zetasizer Nano Series.

b) Características adesivas das NP-OXPt frente à mucina por análise de tamanho

A suspensão das partículas de OXPt foi filtrada em membrana $0,45 \mu\text{m}$ para garantir a homogeneidade do tamanho de partículas. Em seguida, foi preparada uma mistura com proporção 1:1 (v/v) de NP-OXPt e mucina. As dispersões foram agitadas em vortex (IKA, Alemanha) durante 1 minuto e analisadas em triplicata quanto ao diâmetro hidrodinâmico de partículas e PDI no aparelho Zetasizer Nano Series.

c) Características adesivas das NP-OXPt frente à mucina por análise de potencial zeta

A suspensão das partículas de OXPt foi filtrada em membrana 0,45 µm para garantir a homogeneidade do tamanho de partículas. Em seguida, foi preparada uma mistura com proporção 1:1 (v/v) de NP-OXPt e mucina. As dispersões foram agitadas em vórtex (IKA, Alemanha) durante 1 minuto e analisadas em tempos determinados (0, 3, 12, 15, 24 e 30 minutos) quanto ao potencial zeta no aparelho Zetasizer Nano Series. O gráfico relaciona o potencial zeta da dispersão de NP-OXPt tratadas com mucina em função do tempo de incubação.

4.1.8 Estudo de permeação ex vivo de OXPt através da mucosa oral de suínos

a) Validação da recuperação da OXPt a partir da mucosa oral suína

Foram transferidos pedaços da mucosa oral de suínos (área de 1,70 cm²) com o auxílio de tesoura e bisturi para nove tubos falcon separados. Foram então adicionados em triplicata sobre os tecidos alíquotas de 50 µL, 750 µL e 1000 µL de uma solução metanólica a 100 µg.mL⁻¹ de OXPt. Após a evaporação completa do solvente, 5 mL de água Mili-Q foram adicionados a cada tubo e a OXPt retida no tecido foi extraída por agitação exaustiva do tubo pelo período de 24h. As amostras foram filtradas em filtros com porosidade igual à 0,22 µm. A OXPt recuperada foi dosada por CLAE utilizando um equipamento (Shimadzu LC 20-AD, Kyoto Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) de Dionex Co. (Salt Lake City, UT, USA). A fase móvel foi composta por uma mistura de solução aquosa ácida (0,01 M ácido fosfórico): acetronitrila (95:5) (v/v). A vazão foi de 0,5 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 50 µL, o forno foi utilizado à temperatura de 25° C e a detecção UV foi feita em 330 nm, de acordo com o descrito no capítulo 2.

A porcentagem de OXPt quantificada em relação à quantidade total de fármaco adicionada foi considerada como sendo a porcentagem de recuperação.

b) Protocolo Estático de Permeação

O ensaio de permeação *in vitro* foi realizado em quadruplicata, utilizando-se células de difusão verticais do tipo Franz modificadas. O compartimento doador das células foi preenchido com 1 mL das NP-OXPt ou com 1 mL da solução aquosa do fármaco (controle), todas com pH 5,5 e contendo $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OXPt. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução tampão HEPES pH 7,4 e mantido sob agitação magnética à 1000 rpm e à 32°C durante todo o experimento. Após 1 e 2 h de estudo, uma alíquota de 1 mL da solução receptora foi filtrada e analisada por CLAE seguindo o método previamente validado³. Após, foi retirado o excesso da formulação sobre a mucosa com um papel absorvente. A área difusional da mucosa ($1,70 \text{ cm}^2$) foi então fragmentada e imersa em 5 mL de água Milli-Q deixada durante 24 h sob agitação. Essa solução foi filtrada em membrana com porosidade igual à $0,22 \mu\text{m}$ para posterior quantificação da OXPt seguindo-se a metodologia de CLAE previamente validada (Capítulo 2).

c) Protocolo Dinâmico de permeação

Para a execução da permeação dinâmica foi desenvolvido um suporte de isopor retangular com ganchos montados em uma armação de metal. Fragmentos da mucosa oral de porcos foi coletada do animal conforme descrito no (item 4.1.2), mantendo suas estruturas intactas. Cada fragmento de mucosa ($4,0 \text{ cm}^2$) foi colocado horizontalmente e um gancho foi inserido em uma de suas extremidades (Figura 4.3.b). Uma solução aquosa de mucina à 1% p/v (0,5 mL) foi colocado na superfície da mucosa de suínos para mimetizar a mucosa em condições fisiológicas (Figura 4.3.a).

Após 10 minutos, as formulações de interesse: i) Solução aquosa de OXPt e ii) NP-OXPt foram colocadas sobre a mucosa e mantidas na posição horizontal durante 10 minutos, permitindo que as partículas interajam com a mucosa (Figura 4.4.c.) Depois, todos os pedaços de mucosa foram pendurados na posição vertical no suporte e manteve-se nesta posição por 1 h ou 2 h (Figura 4.4.d). Durante este

período de tempo, realizou-se uma lavagem mucosa com 0,5 mL de tampão HEPES 0,01 M isotonzado, pH 7,4, a cada 30 minutos.

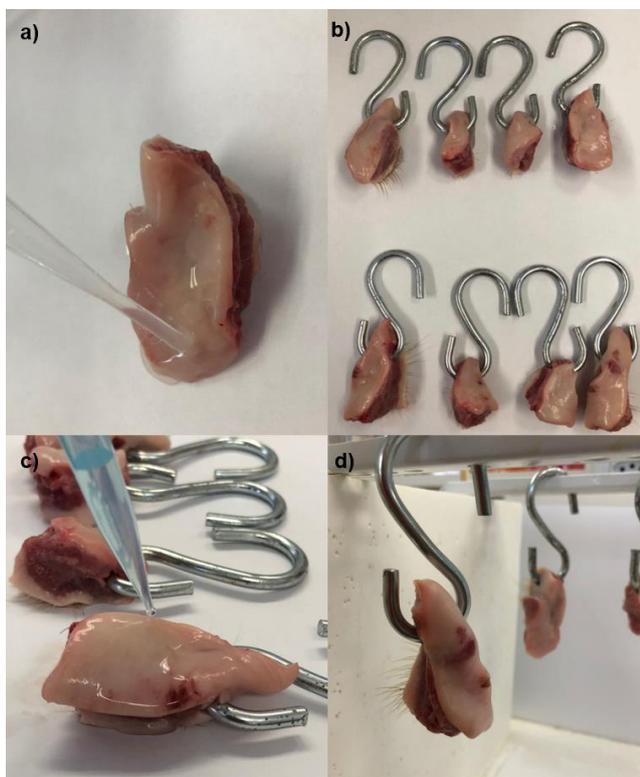


Figura 4.3. Protocolo da permeação dinâmica. (A) Mucosa oral de suínos tratadas com solução de mucina à 1% p/v. (B) Pedacos de mucosa mantidos por 10 minutos após tratamento com mucina. (C) Adição das formulações de interesse e (D) Pedacos de mucosa oral de suínos colocadas em posição vertical no suporte.

No final do experimento, os fragmentos de mucosa foram removidos do suporte, cortado em pequenos pedaços e o fármaco foi extraído de acordo o *ítem* 5.1.8a e quantificado de acordo com o método analítico previamente validado (Capítulo 2).

4.1.9 Estudo de permeação iontoforética *ex vivo* através da mucosa oral de suínos

a) Preparo de Eletrodos

Os eletrodos utilizados nos experimentos de iontoforese foram os eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl) confeccionados no próprio laboratório. Com o auxílio de um bico de Bunsen, em um cadinho de porcelana, foi fundida uma quantidade de cloreto de prata (AgCl) suficiente para mergulhar um pequeno fio de prata com a ponta dobrada conforme esquematizado na Figura 4.4. Após a imersão

por 3 vezes do fio de prata, este foi retirado completamente coberto de cloreto de prata solidificado, obtendo-se, assim, o eletrodo negativo.

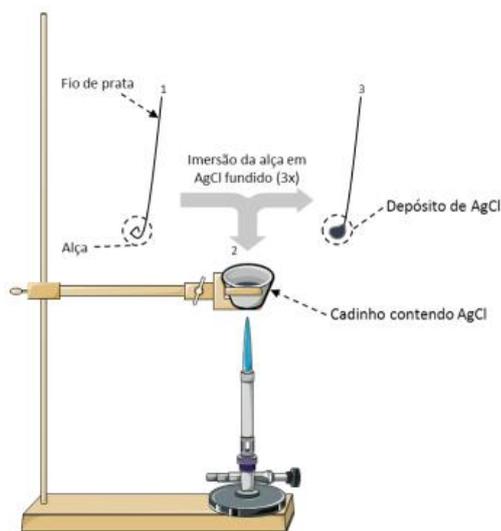


Figura 4.4. Preparo do eletrodo negativo de cloreto de prata (AgCl) (Cátodo). 1) Fio de prata com a alça moldada na ponta. 2) Imersão da alça em AgCl fundido. 3) Formação do eletrodo de cloreto de prata³².

Para o preparo do eletrodo positivo (Ânodo), uma solução salina a $5,78 \text{ mol.L}^{-1}$ foi utilizada para reduzir o AgCl, com o auxílio de um fio de platina e passagem de uma corrente elétrica fraca ($0,2 \text{ mA}$) distribuídos por uma fonte geradora de energia (Futron Data). O terminal positivo da fonte geradora de corrente foi conectado ao fio de platina e o terminal negativo ao eletrodo de AgCl, que foi reduzido em Ag, após a passagem da corrente elétrica por 24h (Figura 4.5).

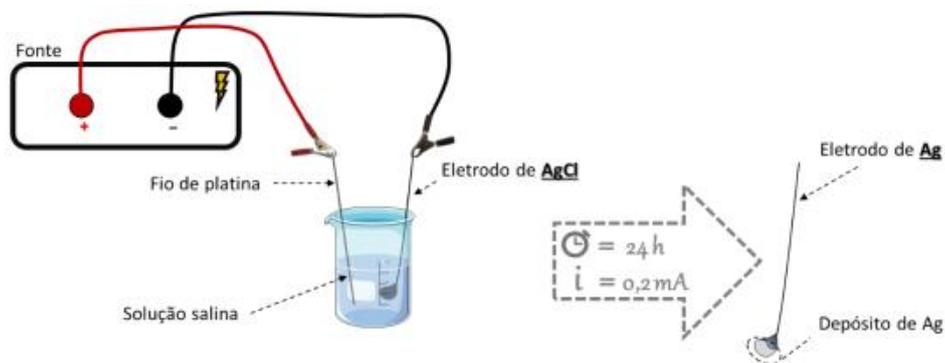


Figura 4.5. Preparo do eletrodo positivo prata (Ag) (Ânodo). Processo de redução do eletrodo de cloreto de prata para a obtenção do eletrodo de Ag³².

b) Estabilidade da OXPt frente a corrente

Previamente à realização do experimento iontoforético *in vitro* em mucosa oral de suínos, a estabilidade do fármaco frente a uma corrente de $0,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ foi analisada. Assim, 10 mL de soluções aquosas contendo $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OXPt salinizadas (pH 6,0) foram preparadas em quadruplicata e montadas em um circuito fechado, expostas à corrente por um período de 2h. As amostras foram então quantificadas seguindo-se o método de CLAE previamente validado (Capítulo 2).

c) Estudo *in vitro* iontoforético em mucosa oral suína

A influência de uma corrente elétrica fraca sobre a penetração do fármaco a partir das formulações também foi avaliada de maneira semelhante aos experimentos de permeação passiva (item 4.1.9b). Para os ensaios, a corrente foi ajustada para $0,5 \text{ mA}/\text{cm}^2$ e os eletrodos positivos e negativos foram introduzidos no compartimento doador e receptor das células de Franz modificadas, respectivamente (Figura 4.6).

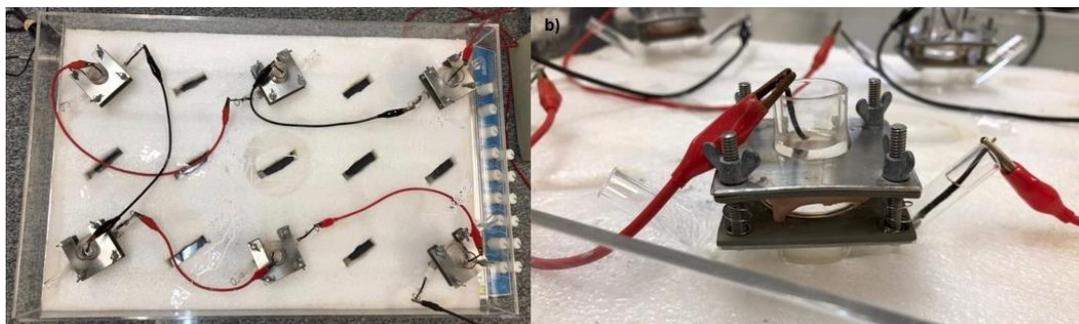


Figura 4.6. Representação esquemática da permeação com iontoforese: (A) Permeação com circuito fechado e (B) Posicionamento dos eletrodos nas células de Franz modificadas.

4.2.10 Ensaio de viabilidade celular

a) Crescimento das células SSC-9 de câncer de língua

As células foram cultivadas em meio DMEM F12 suplementadas com soro fetal bovino (SFB) a 10% em garrafas de cultivo em estufa de 5% de CO_2 à 37°C .

b) Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Para o ensaio de MTT foram plaqueadas 2×10^3 células da linhagem de SSC-

9 em placa de 96 poços, contendo 100 µL de meio DMEM suplementados com 10% de SFB. As SCC-9 foram expostas às formulações de NP-OXPt, NP e a uma solução aquosa de OXPt nas concentrações de 1.5, 2.5, 5.0, 10, 25 e 50 µg.mL⁻¹ por um período de 48 h. As formulações foram previamente preparadas em condições assépticas e filtradas em membrana de 0,45 µm antes de sua utilização.

Nos dias de análise, foram adicionados aos 100 µL de meio de cultura, 20 µL de MTT em cada poço. As placas foram então envolvidas em papel alumínio e mantidas durante 4 h na estufa (CO₂ e 37°C). Após esse período, o meio foi removido, foram adicionados 200 µL de DMSO e a placa colocada em bandeja agitadora durante 15 minutos. Findado esse tempo, foi realizada leitura da absorbância em 570 nm na leitora de placas DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter).

c) Ensaio citometria de fluxo – Anexina e PI

Para o ensaio de citometria, foram plaqueadas 2x10³ células da linhagem de SSC-9 em placa de 6 poços, contendo 3 mL de meio DMEM suplementados com 10% de SFB. As SCC-9 foram expostas à formulação de NP-OXPt, NP e a uma solução aquosa de OXPt nas concentrações de 5.0, 10, 25 µg.mL⁻¹ por um período de 48 h.

As células foram recolhidas dos poços (até 1x10⁶) e acondicionadas em *eppendorfs* identificados. Após, foram centrifugadas, lavadas com PBS e ressuspensas em 330 µL do tampão de Anexina. Foram colocados 5 µL da Anexina V FITC, incubados durante 15 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Enquanto isso, foi preparada uma solução de 100 µL.mL⁻¹ da solução de PI (1 mg.mL⁻¹). Foram adicionados 5 µL da solução PI (100 µg.mL⁻¹) nos 330 µL que foram sendo utilizados para marcação com Anexina e foram analisados imediatamente por citometria de fluxo (BD FACSVerse™).

4.2 Resultados e Discussão

Como foi mencionado anteriormente, a OXPt é um quimioterápico de platina de terceira geração, que tem apresentado bons resultados clínicos para o tratamento dos cânceres de cabeça e pescoço⁴. No entanto, a quimioterapia sistêmica com este fármaco ainda possui uma grande quantidade de efeitos adversos, que podem ser reduzidos ou até eliminados com um tratamento tópico localizado do tumor.

Para viabilizar este tipo de terapia, este trabalho propõe a nanoencapsulação da OXPt utilizando a quitosana como um polímero catiônico com potencial de produzir nanopartículas mucoadesivas^{5,6,7}. Espera-se que essas nanopartículas sejam capazes de permanecer próximas ao tumor após aplicação tópica, promovendo o acúmulo do fármaco no tecido afetado⁵. Ainda, hipotetiza-se que as nanopartículas favoreçam a penetração do fármaco na área afetada e que mantenham a atividade do fármaco frente às células tumorais.

4.2.1 Otimização na obtenção e caracterização das nanopartículas

A técnica de geleificação ionotrópica para obtenção de nanopartículas de quitosana é baseada na interação eletrostática entre o grupamento amino das moléculas das cadeias poliméricas e as cargas negativas do políon TPP. Tanto o tamanho quanto a superfície das nanopartículas formadas dependem principalmente das concentrações do polímero e do agente reticulante utilizado^{9,10} e, inclusive a formação das nanopartículas é restrita a determinadas concentrações de quitosana e TPP em solução. Calvo, *et al.* (1997)¹ demonstraram em seu estudo que para evitar a obtenção de partículas em escala micrométrica, as concentrações de quitosana e TTP deviam estar abaixo de $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

A Figura 4.7 mostra a relação entre as concentrações da solução de quitosana e da solução de TPP na formação de nanopartículas com o valor de pH do sistema fixado em 4.5.

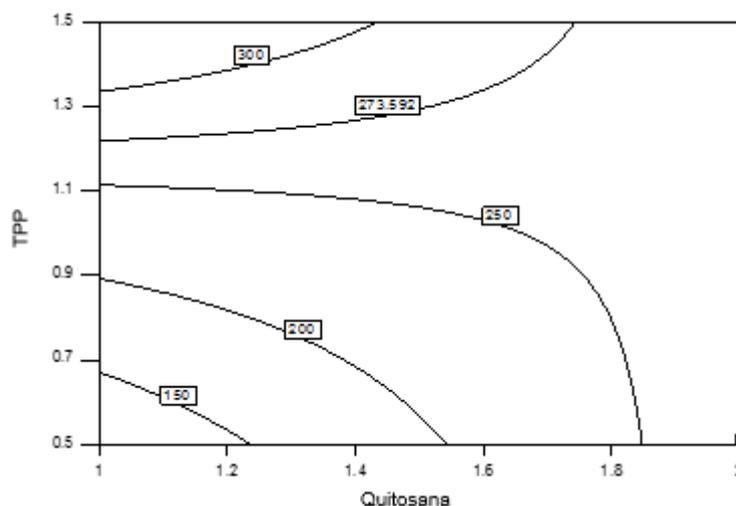


Figura 4.7. Relação entre concentração de TPP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e a concentração de quitosana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) com o tamanho (nm) das partículas com o valor de pH do sistema fixado em 4,5 ($p < 0,0001$).

O aumento da concentração de quitosana e TPP foi proporcional ao aumento do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas. O resultado é condizente com o encontrado por Fan, *et al.* (2012)⁹, que evidenciaram haver uma correlação direta entre o aumento do tamanho médio das partículas e o aumento da concentração da solução de quitosana e TPP durante o seu preparo. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que sob condições ácidas há uma repulsão eletrostática entre as moléculas de quitosana, mesmo que ainda existam ligações de hidrogênio favorecendo a atração intermolecular. Abaixo da concentração de $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, parece que as ligações de hidrogênio entre as moléculas de quitosana e a força de repulsão intramolecular estão em equilíbrio. Dessa forma, o aumento da concentração de quitosana leva a um aumento das interações intermoleculares, favorecendo assim o aumento do tamanho médio das partículas formadas^{11,12}.

A Figura 4.8 apresenta a correlação entre a concentração de TPP em solução e do pH da solução inicial de quitosana com o PDI das partículas.

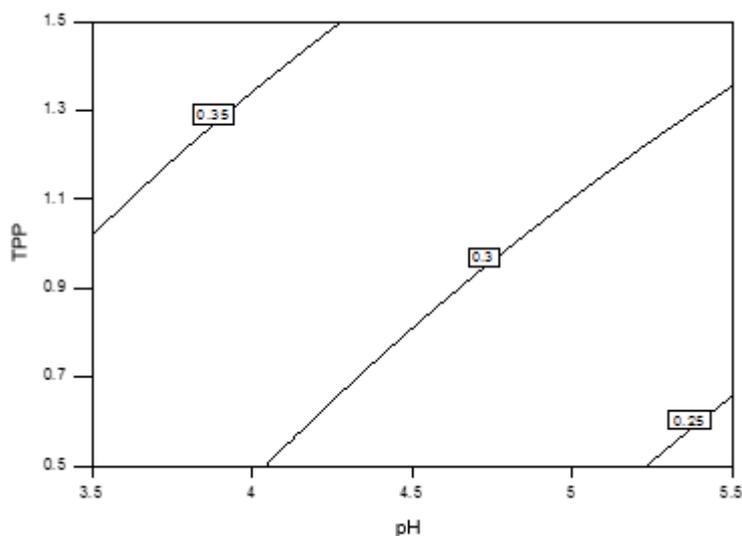


Figura 4.8. Relação entre concentração de TPP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o pH com o PDI das partículas com o valor da solução de quitosana fixada em $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,0001$).

Para valores de pH da solução inicial de quitosana próximos ao valor de 5,5, as nanopartículas apresentaram valores de IPD abaixo de 0,25. Sabe-se que o pKa da quitosana é 6,5 e que, dessa forma, o grau de protonamento das cadeias poliméricas é basicamente controlado pelo pH. A carga e o número de espécies iônicas de TPP também é alterado pelo pH da solução de quitosana. No pH original da solução de TPP (9,7), a concentração de íons tripolifosfato é alta. Esses íons podem interagir com os grupamentos amino presentes na molécula de quitosana. Portanto, infere-se que, quando o TPP é gotejado sobre a solução aquosa ácida de quitosana e o pH da solução de quitosana está abaixo de 5,5, os íons da solução de TPP são neutralizados parcialmente pelos íons da solução de quitosana, permitindo a formação das partículas a partir da ligação dos íons de tripolifosfato com a cadeia polimérica da quitosana, ao invés da obtenção por uma forte repulsão eletrostática entre as cadeias. Porém, quando o pH está próximo de 5,5, os íons atuam na protonação da cadeia polimérica de quitosana deixando-a menos estendida, favorecendo a formação de partículas menos dispersas e com maior grau de homogeneidade¹⁰.

A Figura 4.9 mostra a correlação entre o aumento da concentração da solução de quitosana e a diminuição da concentração de TPP em solução com o aumento dos valores potencial zeta das partículas formadas.

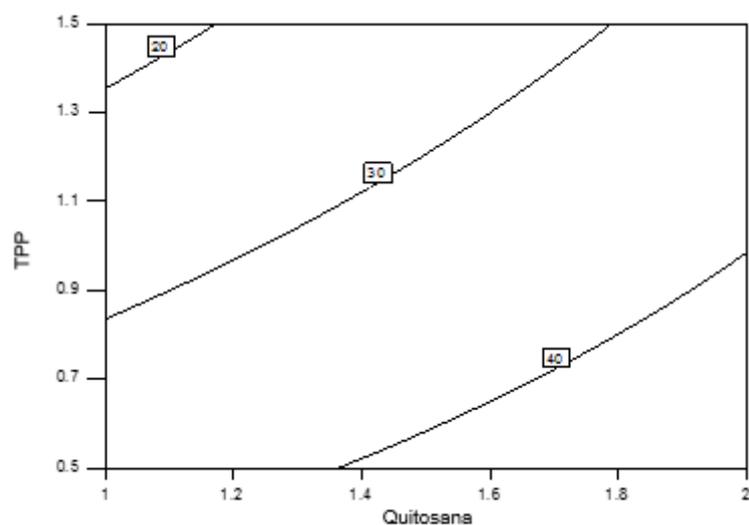


Figura 4.9. Relação entre concentração de TPP ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e a concentração de quitosana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) com o potencial zeta das partículas com o valor de pH fixado em 4,5 ($p < 0,0001$).

Fan, *et al.* (2012)⁹ já mostraram que o aumento da concentração de TPP de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ diminuía os valores de potencial zeta das partículas de +39 mV para + 26 mV. Essa diminuição do valor potencial zeta está relacionado à neutralização dos grupamentos aminos da molécula de quitosana pelos íons do TPP¹⁰.

Na Figura 4.10 observa-se a relação do pH da solução inicial de quitosana e da concentração da solução de quitosana com o potencial de carga superficial das nanopartículas.

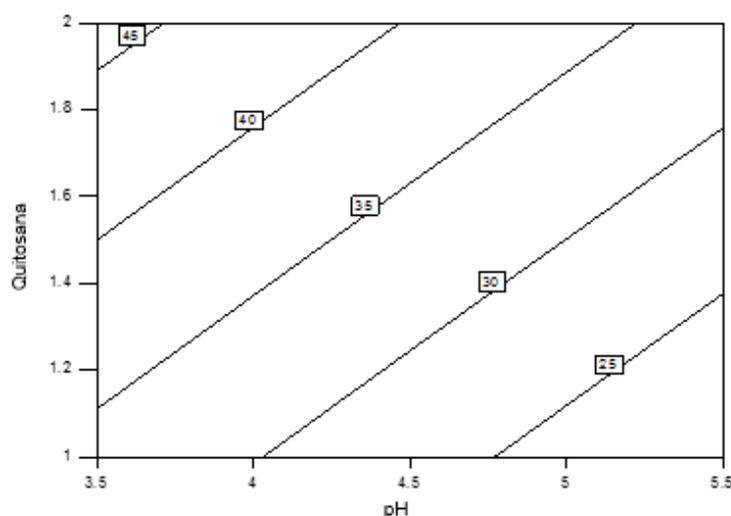


Figura 4.10. Relação entre concentração de quitosana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o pH com o potencial zeta das partículas com o valor da solução de TPP fixado em $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,0001$).

O aumento da concentração da solução de quitosana em um pH próximo a 3,5 favoreceu a obtenção de partículas com valores mais positivos de potencial zeta, que deverão influenciar tanto na estabilidade quanto na adesividade da nanodispersão.

Após a análise estatística do estudo para obtenção otimizada das nanopartículas, as melhores condições que resultaram em partículas de $103,09 \pm 20 \text{ nm}$, com IPD de $0,265 \pm 0,02$ e potencial zeta positivo ($+45,59 \pm 3 \text{ mV}$) foram solução de quitosana à $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com pH ajustado para 5,5 e solução de TPP à $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Partindo-se dessas condições estabelecidas, adicionou-se à solução inicial de quitosana diferentes proporções de OXPt para obtenção de nanopartículas contendo o fármaco.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada avaliando-se através do método de centrifugação utilizando-se um ultrafiltro Vivaspin. A Tabela 4.3 apresenta os valores de EE% das diferentes proporções de polímero/fármaco (m/m).

Tabela 4.3. Eficiência de encapsulação obtida com diferentes proporções de polímero/fármaco durante o preparo das nanopartículas de OXPt a partir do método Vivaspin.

Amostra	Proporção polímero/fármaco	EE (%) - Método centrifugação Vivaspin
NP-OXPt 1	1:1	89,10 ± 4,67*
NP-OXPt 2	2:1	87,30 ± 0,04*
NP-OXPt 3	3:1	62,04 ± 0,04*

*Há diferença significativa entre os valores de EE% nas diferentes proporções de fármaco/polímero testados ($p < 0,05$).

Considerando a alta solubilidade aquosa da OXPt em água ($8,74 \pm 0,10$ mg/mL; $\log P = -2,06 \pm 0,22$)³³ pode-se inferir que este alto potencial em encapsular o fármaco deve-se provavelmente ao fato da rede de hidrogel formada pelas nanopartículas de quitosana ser capaz de adsorver grandes quantidades de água em sua estrutura, permitindo assim uma alta interação entre a OXPt hidrofílica e a matriz polimérica que compõe as nanopartículas^{12,13}.

Li, *et al.* (2008)¹², de maneira semelhante, obtiveram nanopartículas de quitosana de paclitaxel com EE% superior a 94% e mostraram que para uma relação em que a presença do polímero é menor em relação à quantidade de fármaco, a EE% aumenta de 32% para 94%.

A Tabela 4.4 apresenta a comparação do diâmetro hidrodinâmico médio, IPD e potencial zeta NP com as NP-OXPt encapsulando o fármaco na proporção de 1:1 (m/m). Esses resultados evidenciam que a presença do fármaco nas partículas aumentou o seu tamanho em 80% em média, sem no entanto alterar de maneira significativa seu IPD ou potencial zeta, o que poderá ser confirmado mais adiante pela análise das fotomicrografias das NP-OXPt.

Tabela 4.4. Comparação do diâmetro hidrodinâmico médio (nm), IPD e potencial zeta (mV) das NP com as NP-OXPt preparadas na proporção 1:1 (m/m) fármaco/polímero.

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	IPD
NP	103,09 ± 20,0*	+45,59 ± 3,0	0,265 ± 0,02
NP-OXPt	188,43 ± 19,7*	+44,81 ± 2,8	0,276 ± 0,02

* Há diferença significativa entre os valores ($p < 0,05$).

A Figura 4.11 apresenta imagens das NP e das NP-OXPt capturadas por MEV. As partículas apresentaram-se esféricas, homoganeamente distribuídas. Este resultado é condizente com o observado em outros estudos em que nanopartículas de quitosana foram preparadas ^{9,13,14}.

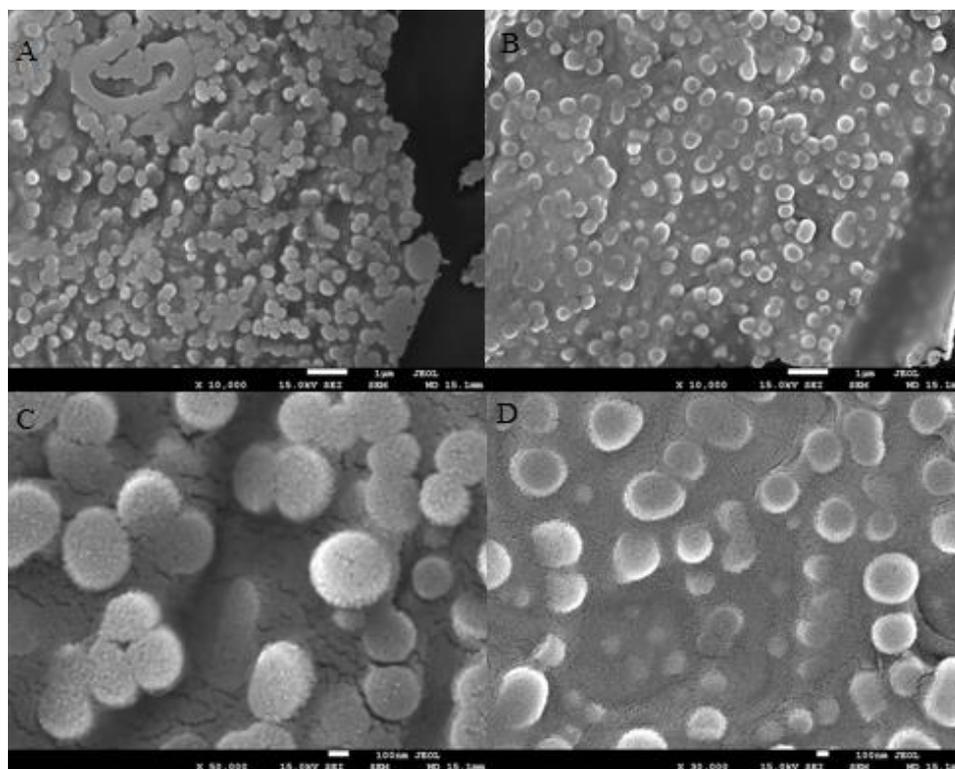


Figura 4.11. Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (Quanta FEG 250 FEI, USA) em aumento de: A) 10.000 X, B) 20.000 X, C) 30.000 E D) 40.0000 X para as NP (A e C) e NP-OXPt (B e D).

4.2.2 Estabilidade NP-OXPt

A estabilidade das NP e das NP-OXPt foram avaliadas nos dias 0 (logo após o preparo), 1, 3, 7, 15, 30 e 60, em quadruplicata, armazenadas à temperatura de 25°C e em geladeira à temperatura de 10°C. As análises foram realizadas por meio da observação das possíveis alterações do diâmetro hidrodinâmico da partícula, potencial zeta, IPD e das características organolépticas.

Ao longo dos meses, as partículas numa dispersão coloidal podem se aderir umas às outras, formando agregados, que sob a influência da gravidade se sedimentam. Tal comportamento compromete a estabilidade física da dispersão, o que reduz o seu tempo de armazenamento e a validade de um medicamento contendo essas partículas¹⁵.

A Figura 4.12 A e B indica as médias dos diâmetros hidrodinâmicos das partículas, ao longo de 60 dias, de amostras armazenadas à temperatura de 25°C e à temperatura de 10°C. As nanopartículas de quitosana armazenadas à temperatura de 25°C e com 10°C, encontraram-se estáveis ao longo do tempo.

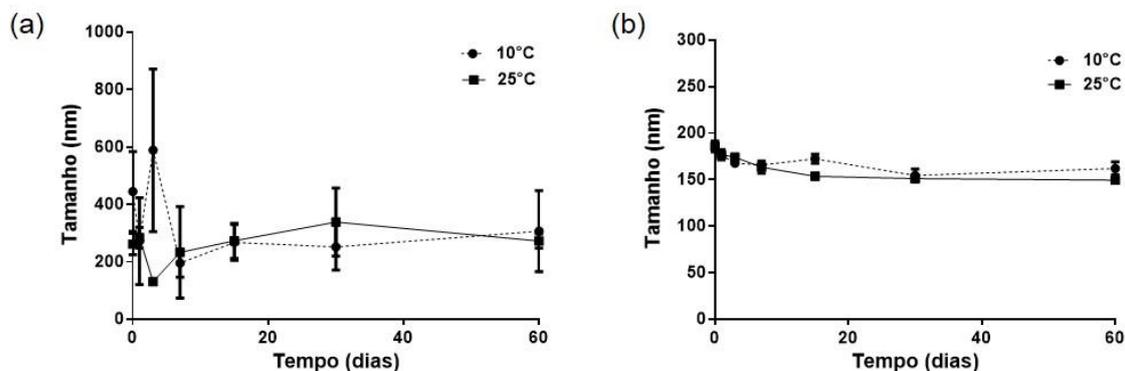


Figura 4.12. Diâmetro hidrodinâmico da dispersão de nanopartículas (nm) em função do tempo (dias) referente às replicatas armazenadas a temperatura de 10°C e 25°C.

Como já foi mencionado, o IPD fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos. Menores valores de IPD, portanto, indicam uma amostra mais homogênea, em relação ao diâmetro das partículas¹⁶. Durante dois meses, o IPD (Figura 4.13 A e B) das nanopartículas armazenadas a temperatura de 25°C e à temperatura de 10°C foram medidos, e os diâmetros hidrodinâmicos das partículas se mantiveram constantes.

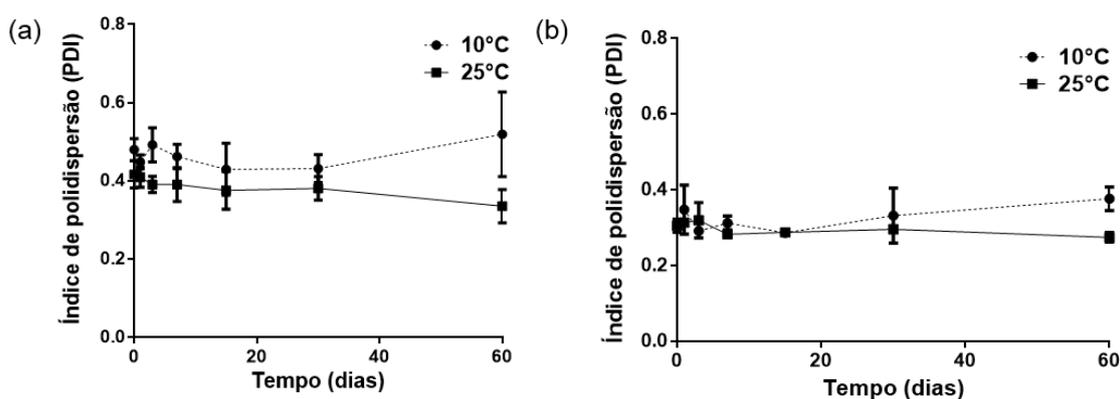


Figura 4.13. PDI da dispersão de nanopartículas (nm) em função do tempo (dias) referente às replicatas armazenadas à temperaturas de 10°C e 25°C.

As cargas positivas das nanopartículas permaneceram constantes ao longo do tempo de análise, tanto nas replicatas armazenadas à 25°C, quanto nas replicatas

armazenadas à 10°C (Figura 4.14). Assim, as propriedades mucoadesivas das nanopartículas que entrarão em contato com a mucosa devem estar garantidas.

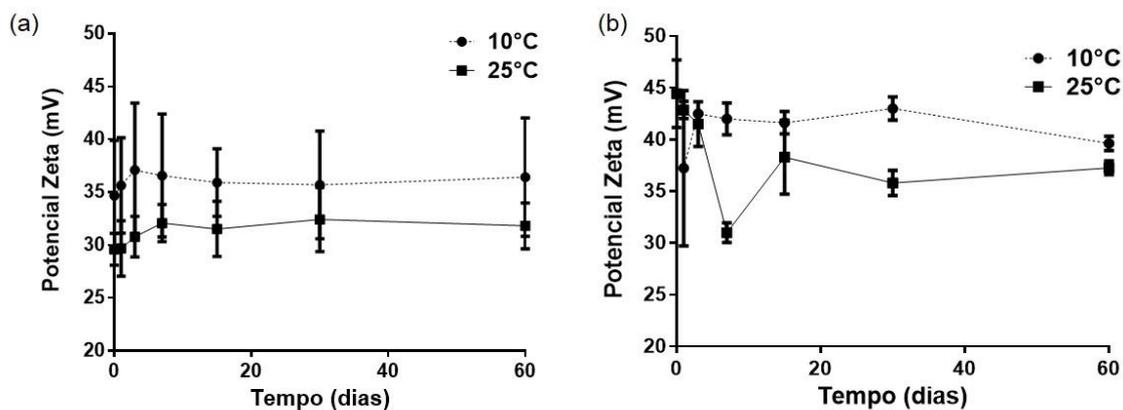


Figura 4.14. Potencial zeta (mV) da dispersão de nanopartículas em função do tempo referente às replicatas armazenadas à temperaturas de 10°C e 25°C.

A Figura 4.15 mostra que a variação dos valores do teor ao longo de todo o período foi mínima, perda de menos 5%, corroborando com a estabilidade das dispersões durante os 2 meses de análise.

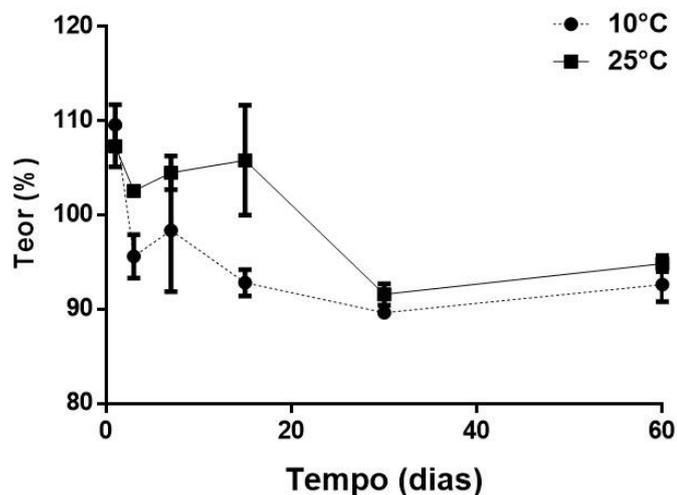


Figura 4.15 Teor (%) da dispersão de nanopartículas em função do tempo referente às replicatas armazenadas à temperaturas de 10°C e 25°C.

4.2.3 Estudos *in vitro* de liberação da OXPt a partir das NP-OXPt

O estudo de liberação foi realizado *in vitro* com o objetivo de avaliar a velocidade com que o fármaco era liberado das partículas. O perfil de liberação da

OXPt nanoencapsulada foi comparado à difusão de uma solução aquosa de OXPt, contendo mesma quantidade de fármaco livre (1,5% m/v) e pH (5,5) através da membrana de acetato de celulose que se utilizou como suporte nesse tipo de experimento (Figura 4.16).

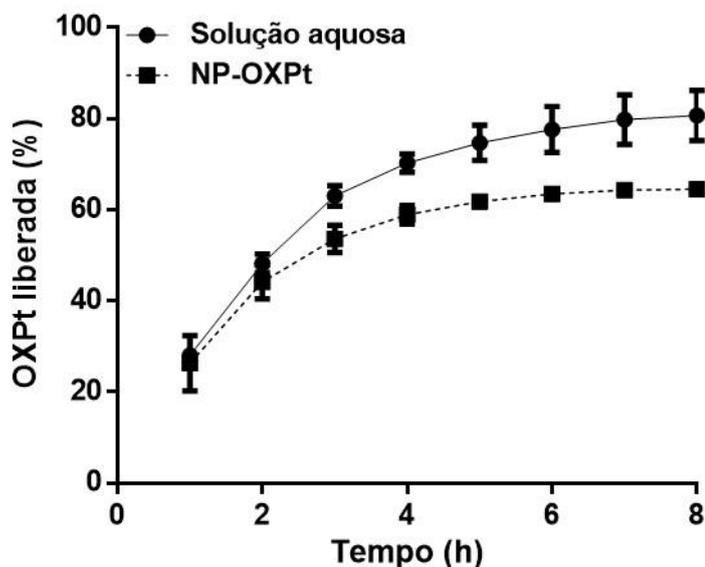


Figura 4.16. Perfis de liberação da OXPt a partir da formulação NP-OXPt contendo 1,5 µg/mL do fármaco, pH 5,5 em comparação a uma solução aquosa do fármaco contendo a mesma concentração de OXPt e mesmo pH.

A partir da quarta hora de estudo, as partículas reduziram em 30% a taxa de liberação do fármaco em comparação ao controle e a partir da sexta hora de experimento a liberação do fármaco pela NP estabilizou-se em aproximadamente 60%. Esse resultado difere de outro estudo publicado para NP contendo o mesmo fármaco, em que se observou um controle maior da liberação do fármaco nanoencapsulado¹⁴. Uma possível explicação seria que no presente estudo, além do método de preparo da partícula ter sido diferente, o pH final da formulação foi mantido mais ácido (5,5) o que pode ter favorecido a expulsão de fármaco da partícula.

Cabe ressaltar que este resultado é benéfico para o que se espera das NP-OXPt neste estudo, ou seja, que ela sirva para aderir-se à mucosa oral e favorecer a penetração do fármaco através desse tecido para que ele se acumule no tumor.

4.2.4. Avaliação *in vitro* do potencial mucoadesivo das NP-OXPt

As propriedades mucoadesivas da quitosana são atribuídas principalmente ao seu caráter catiônico^{17,18}, que permite que a macromolécula se ligue iônica e covalentemente à mucina, que é componente importante do muco e possui carga negativa. Além disso, os grupamentos amino e carboxila presentes na molécula de quitosana podem combinar com as glicoproteínas presentes no muco, contribuindo também com o efeito de bioadesão^{19,20,21}. Quanto maior for o grau de desacetilação da molécula de quitosana maior será o nível de adesão²². Por esta razão, as nanopartículas foram produzidas com quitosana com grau de desacetilação superior à 75%.

A Figura 4.17A mostra que os diâmetros médios iniciais das partículas de mucina e da NP-OXPt foram de 476 nm e 144 nm, respectivamente. Após um período de incubação, uma única população de 1649 nm foi observada, indicando que as NP-OXPt com carga superficial positiva se associaram fortemente com as partículas de mucina de carga negativa formando grandes aglomerados^{23,24}.

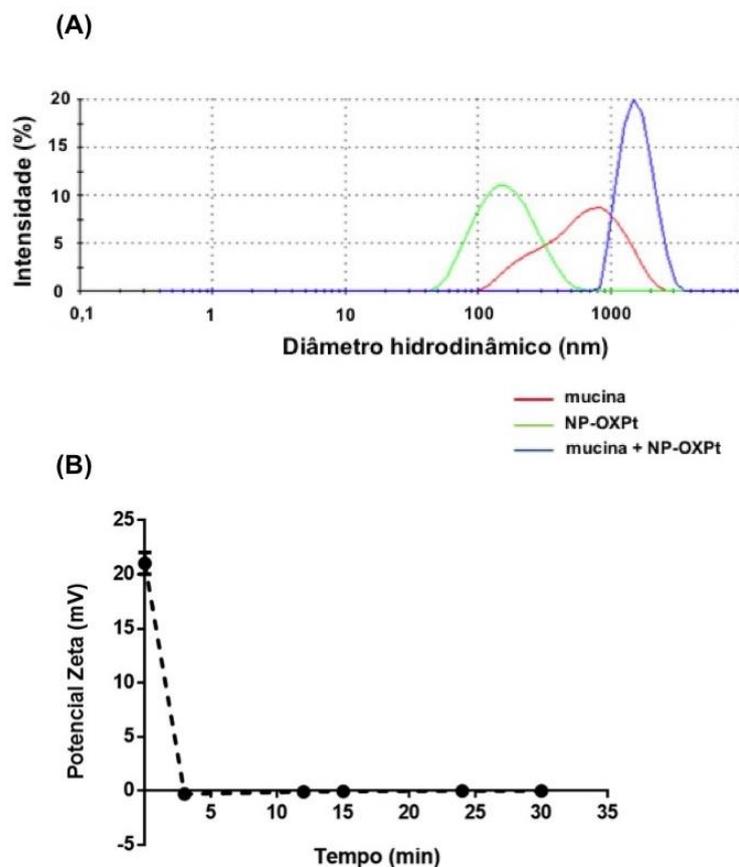


Figura 4.17. Determinação *in vitro* da mucoadesividades das NP-OXPt. (A) Distribuição de diâmetro hidrodinâmico referente às amostras de NP-OXPt, de mucina e de NP-OXPt incubadas com mucina. (B) Potencial zeta das NP-OXPt em função do tempo de incubação com soluções de mucina.

A Figura 4.17B corrobora a ocorrência da ligação entre a mucina e as NP-OXPt resultando no súbito decaimento do potencial zeta positivo²⁵ das NP-OXPt logo nos primeiros 3 min de incubação com as partículas de mucina. Pode-se observar que os valores de carga positiva das NP-OXPt ($+44,81 \pm 2,8$ mV) se aproximaram de zero antes dos 5 min de incubação.

Estes resultados são indicativos da mucoadesividade das NP-OPXt e é esperado, portanto, que após aplicação na mucosa oral elas se associem à membrana por período suficiente para promover acúmulo da OXPt no tecido tumoral.

4.2.5 Estudo de permeação *ex vivo* através da mucosa de suínos

a) Recuperação OXPt da mucosa oral de suínos

Os testes de recuperação do fármaco foram realizados com o intuito de se validar o processo de extração da OXPt da mucosa oral suína. Por se tratar de uma molécula hidrofílica, a água foi usada como solvente extrator.

Na Tabela 4.5 estão apresentados os resultados da recuperação da OXPt extraída com 5 mL de água da mucosa oral suína após serem contaminadas com diferentes concentrações do fármaco.

Tabela 4.5. Valores de recuperação em % de OXPt a partir de mucosa oral suína.

Concentração OXPt ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperada de OXPt
1,0	$1,06 \pm 0,9$	$106,0 \pm 8,9$
15,0	$16,4 \pm 0,7$	$109,6 \pm 4,4$
20,0	$18,4 \pm 0,3$	$92,2 \pm 6,5$

O processo de extração da OXPt da mucosa suína mostrou-se eficiente dentro do intervalo de linearidade ($1,0$ a $20,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do método analítico validado para a extração da OXPt por CLAE-UV (Capítulo 2). A recuperação do fármaco foi realizada com porcentagens de erro que estão dentro do limite aceito para a validação de métodos envolvendo extração de fármaco em matrizes biológicas ($\pm 15\%$)⁸. Desta forma, garante-se que a metodologia padronizada é adequada para quantificação da OXPt presente na mucosa oral suína.

b) Estudo de permeação *ex vivo* através da mucosa oral de suínos seguindo-se os protocolos estático e dinâmico

A Figura 4.18 mostra a quantidade de OXPt recuperada da mucosa oral ($\mu\text{g.cm}^{-2}$) após 1 e 2 h de tratamnto seguindo os protocolos estático e dinâmico, a partir da solução controle e das NP-OXPt.

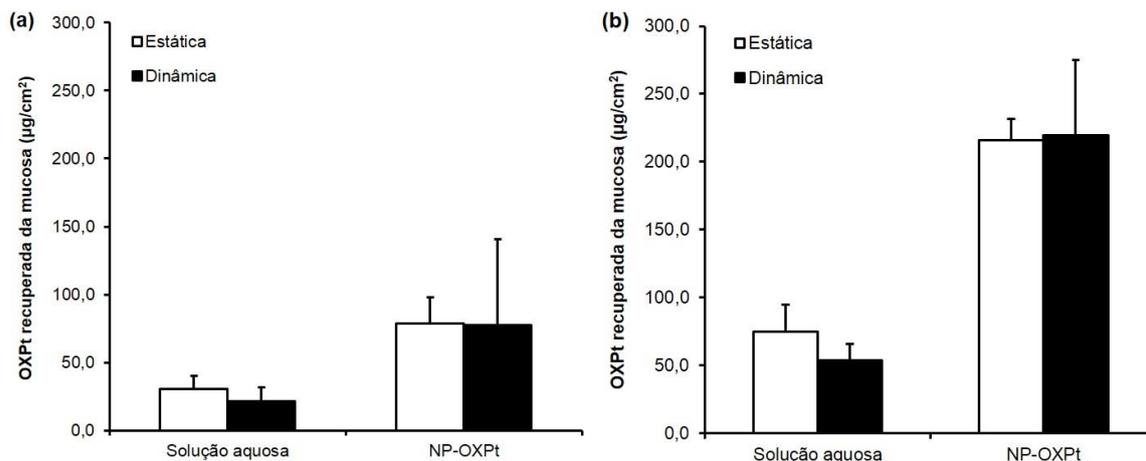


Figura 4.18. Quantidade de OXPt ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) retida na mucosa após a) 1h e b) 2 h de tratamento com as NP-OXPt em comparação ao controle (solução aquosa de OXPt) seguindo-se os protocolos estático e dinâmico (n=4).

O tratamento estático da mucosa com as NP-OXPt, ou seja, aquele em que a formulação foi deixada durante todo o tempo de experimento em contato com a mucosa inserida na célula de difusão, resultou em maior recuperação do fármaco na mucosa suína se comparado ao tratamento com a solução de OXPt (Figura 4.19). O aumento observado foi de 3 vezes e estatisticamente diferente ($p>0.05$) nas duas horas de estudo (1 h e 2 h).

Sabe-se que a quitosana é um polissacarídeo natural que além de possuir biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-toxicidade, também apresenta algumas características notáveis como aquelas de bioadesividade e de promoção de permeação²⁴⁻²⁷. Assim, muitos estudos mostraram que a quitosana é capaz de melhorar significativamente a absorção de fármacos nos tecidos biológicos, principalmente em mucosas e pele²⁴⁻²⁷. O mecanismo de ação proposto é que a quitosana positiva se ligue aos sítios negativamente carregados das membranas celulares epiteliais promovendo a despolimerização da F-actina e a dissolução da proteína ZO-1 das junções de oclusão. Portanto, ela favorece a abertura das junções de oclusão promovendo assim a maior liberação do fármaco encapsulado para os tecidos²⁸⁻²⁹. Isto de fato foi observado em nossos estudos de permeação.

Os resultados do método de permeação aqui denominado estático e o método “dinâmico”, em que a formulação foi aplicada sobre a mucosa disposta horizontalmente e após foi mantida na posição vertical e sendo constantemente lavada com uma solução fisiológica, foram comparados neste estudo com o intuito

de se desafiar a formulação para uma condição mais fisiológica dentro da cavidade oral.

De fato, o que se observou foi que enquanto a solução do fármaco livre teve sua absorção reduzida em aproximadamente 30% com a aplicação do novo método, as NP-OXPt foram capazes de manter concentrações idênticas do fármaco no tecido ($p > 0,005$). Este resultado é mais um indício de que as NP desenvolvidas apresentaram propriedades mucoadesivas e que seriam um sistema adequado para tornar possível a terapia tópica de tumores orais com o quimioterápico estudado.

4.2.6 Permeação iontoforética *ex vivo* através da mucosa oral de suínos a partir das formulações NP-OXPt e controle

A Figura 4.19 apresenta os resultados obtidos após a aplicação das permeações passiva e iontoforética para as formulações do estudo.

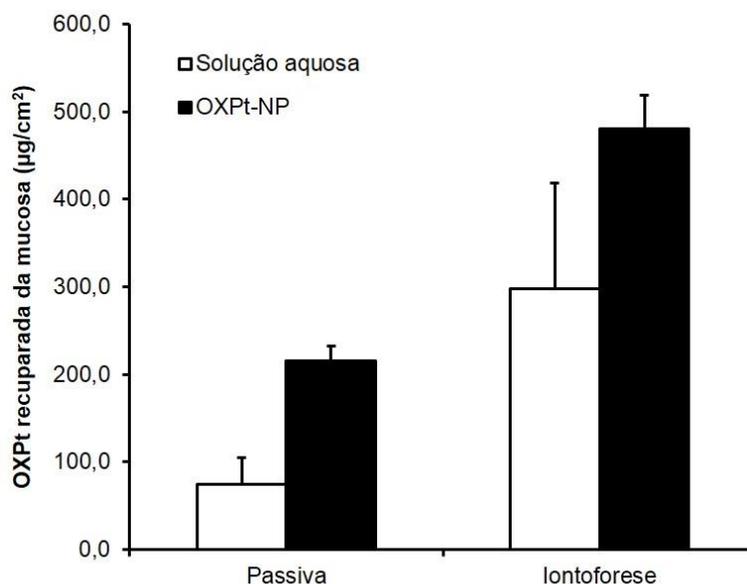


Figura 4.19. OXPt recuperado da mucosa suína após 2 h de tratamento passivo e iontoforético com uma solução aquosa de OXPt ($1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 5,5) e com nanopartículas de quitosana carregadas com OXPt ($1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 5,5) ($n=4$).

A iontoforese é a aplicação de uma corrente elétrica fraca ($\leq 0,5 \text{ mA/cm}^2$) de baixa voltagem que facilita a transferência de espécies carregadas ou não através

de membranas biológicas³⁶. De fato, a iontoforese aumentou a penetração da OXPt, tanto para o fármaco em solução, quanto para as NP-OXPt. O aumento foi de aproximadamente 2 vezes para a solução aquosa e 3 vezes para as NP-OXPt ($p > 0,005$) quando comparados iontoforese com a permeação passiva.

A solução de OXPt, que não apresenta carga residual, tem a molécula carregada pelo fluxo eletrosmótico gerado no eletrodo positivo, que nada mais é que um fluxo de solvente provocado pela entrada preferencial de íons positivos na mucosa negativamente carregada. O campo elétrico aplicado favorece o movimento de íons no sentido do ânodo para o cátodo, na tentativa de neutralizar as cargas negativas da membrana. Ao se movimentarem, esses íons carregam um certo volume de solvente, movimentando também as moléculas neutras presentes no sistema.

Colaboradores internacionais de nosso grupo já avaliaram o efeito da iontoforese no aumento da penetração de quimioterápicos com características físico-químicas semelhantes à OXPt na mucosa oral. Gratieri e Kalia³⁶ mostraram que a iontoforese resultou em um aumento estatisticamente significativa de 8 e 3 vezes da deposição na mucosa oral de 5-fluoracila e leucoverina, respectivamente, em comparação com suas difusões passivas.

Como as NP-OXPt apresentam carga residual positiva, poderia-se inferir que elas seriam carregadas para dentro da mucosa pelo mecanismo de eletrorrepulsão, ou seja, que a partícula contendo o fármaco seria repelido pelo eletrodo positivo atravessando a mucosa, além de ser beneficiada do fluxo eletrosmótico que, como mencionado, favorece o transporte de cátions ou espécies positivamente carregados^{30,31}. No entanto, considerando-se que o tamanho das nanopartículas é relativamente grande para atravessar uma membrana biológica em que as células estão intimamente ligadas e que a mucosa, diferente da pele, não possui nenhum atalho, como são as glândulas e folículos pilosos, acredita-se que a corrente elétrica foi responsável apenas pelo maior transporte do fármaco livre para a membrana mucosa.

Assim sendo, ambas as abordagens, passiva e iontoforética, parecem ser viáveis. A passiva é de mais simples utilização, pois não requer o uso da corrente elétrica, ao passo que a iontoforética permite uma maior penetração do fármaco. Ainda, espera-se que em uma situação *in vivo*, o acúmulo promovido pelas nanopartículas seja mais significativo comparado à solução, pois essas

nanoestruturas de quitosana são mucoadesivas e não escorrem na mucosa, como ocorre na formulação contendo a solução.

4.2.7 Ensaios *in vitro* de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados para avaliação do potencial inibitório das formulações frente à linhagem celular do câncer de língua humana (linhagem SCC-9) como observado na Figura 4.20.

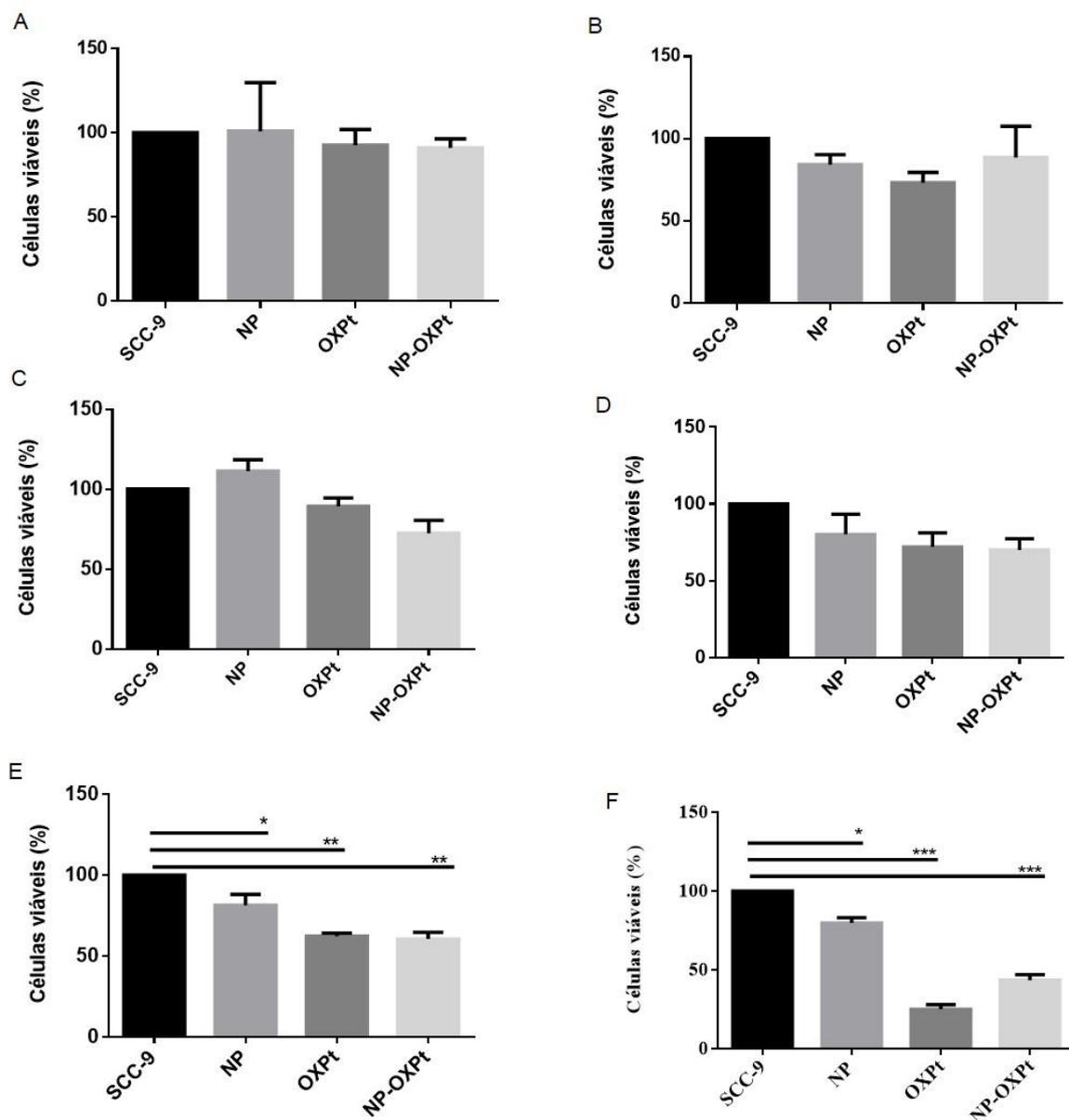


Figura 4.21. Quantidade de células viáveis (%) após o tratamento com: i) OXPt = solução aquosa de OXPt, ii) NP = nanopartículas de quitosana sem fármaco e iii) NP-OXPt, sendo a concentração final de OXPt respectivamente: A) 1.5 µg.mL⁻¹ B) 2.5 µg.mL⁻¹ C) 5.0 µg.mL⁻¹ D) 10 µg.mL⁻¹ E) 25 µg.mL⁻¹ F) 50 µg.mL⁻¹. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,002.

Na Figura 4.21 acima, observa-se que o tratamento das células com concentrações de 1.5, 2.5 5.0 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OXPt não mostrou redução da viabilidade celular independente do tratamento estudado (NP, OXPt livre ou NP-OXPt). Em alguns casos como pode ser verificado na Figura 5.21.C no grupo de tratamento das NP, houve uma maior proliferação celular quando comparada ao controle positivo. Já para as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OXPt, houve diferença significativa ($p < 0,005$ e $p < 0,002$, respectivamente) entre os tratamentos. Quando comparados ao controle negativo, todos os grupos tratados apresentaram diminuição na porcentagem de células viáveis. O grupo composto somente por partículas de quitosana (NP) apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) para ambas as concentrações avaliadas (Figura 5.20 E e F).

Já Vivek, *et al.* (2014)¹⁴ analisaram a toxicidade de suas nanopartículas de quitosana contendo OXPt frente à linhagem celular MCF-7 do câncer de mama. Os pesquisadores verificaram diminuição da viabilidade celular com exposição por 48 h à OXPt livre e OXPt incorporadas em nanopartículas de quitosana na faixa de concentração estudada (1 a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e a viabilidade variou entre 88 e 34% para a OXPt livre e de 72 a 13% para a OXPt nanoencapsulada. Em nossos estudos, a faixa tóxica para a linhagem celular de câncer de língua foi maior (entre 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), com viabilidade celular de aproximadamente 75% a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, independente da forma encapsulada ou não da OXPt, e viabilidade igual a 85 ou 75% para o fármaco livre ou nanoencapsulado, respectivamente. A toxicidade da NP de quitosana sem o fármaco foi sutil (75%, $p < 0,05$), mas significativo se comparado com o controle negativo.

Na Figura 4.22 observa-se a quantidade em porcentagem de células viáveis e células apoptóticas quando comparadas ao controle negativo a partir dos três tratamentos distintos (NP, OPXt e NP-OXPt) utilizando-se as concentrações de OXPt correspondentes a: a) 5.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ b) 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ c) 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

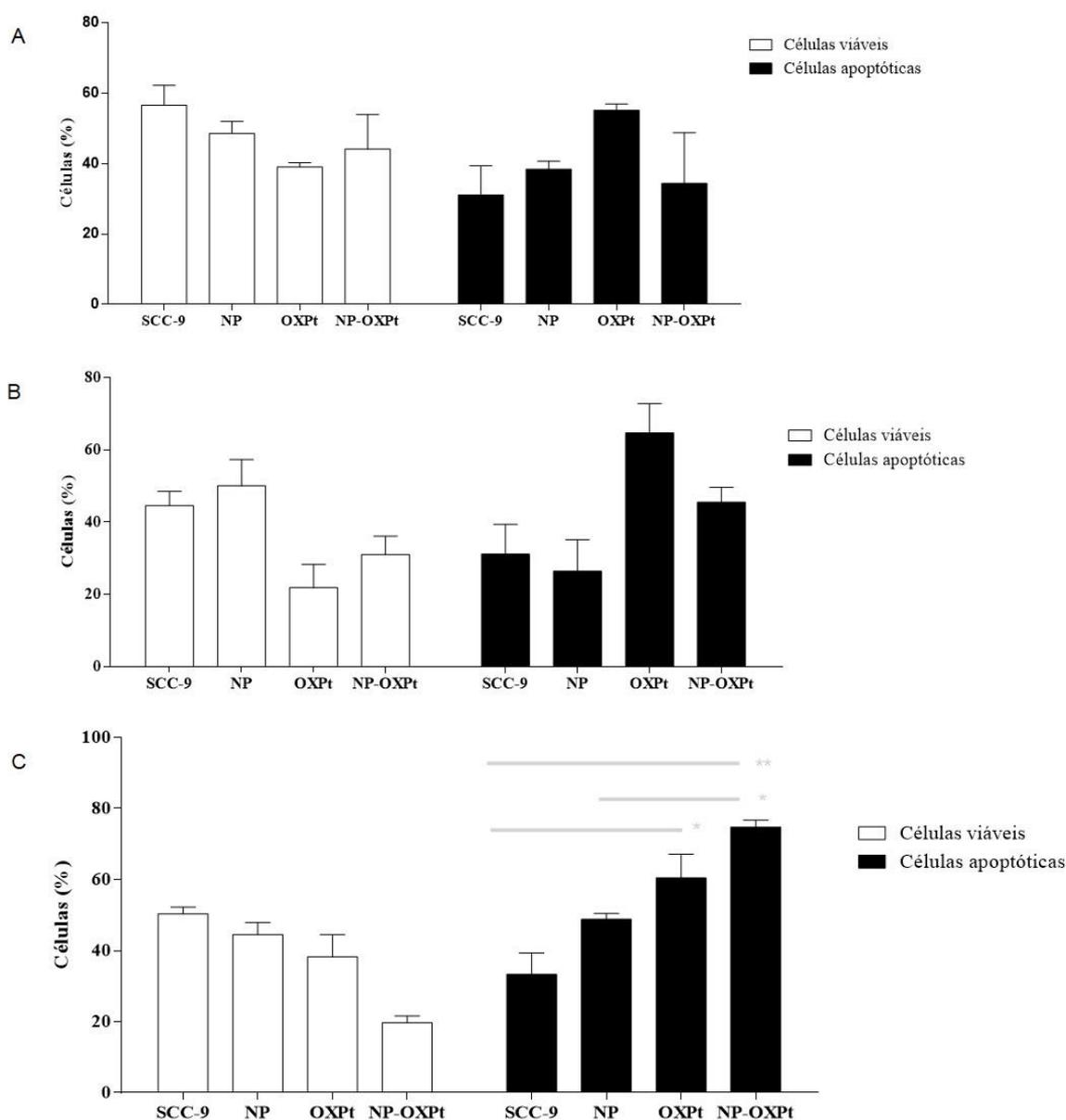


Figura 4.22. Porcentagem de células viáveis e apoptóticas após o tratamento com: i) solução aquosa de OXPt, ii) NP-QS e iii) NP-OXPt, sendo a concentração final de OXPt respectivamente: a) $5.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ b) $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ c) $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Em todas as concentrações analisadas e em todos os tratamentos houve uma tendência na diminuição de células viáveis e um aumento de células apoptóticas. Porém, somente a concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou uma diferença estatística com para o aumento das células apoptóticas. A indução da apoptose em células cancerosas é uma característica crítica dos quimioterápicos. O mecanismo principal do dano da OXPt aos tumores é através da indução do

apoptose, mas o mecanismo celular e molecular da ação desse fármaco ainda não foi esclarecido inteiramente. Evidências recentes indicam que o PUMA, um membro importante da proteína da família Bcl-2, é um importante mediador de apoptose induzido por uma série de quimioterápicos³⁹.

Vivek, *et al.* (2014)¹⁴ também verificaram uma importância do mecanismo de apoptose para a atividade da OXPt, em que a apoptose de células MCF-7 de câncer de mama aumentou para $21,3 \pm 1,57\%$, $54,4 \pm 5,79\%$, e $93,6 \pm 11,52\%$, quando as foram tratadas por 48 h com 10, 15 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OXPt incorporadas em nanopartículas quitosana, respectivamente.

Portanto, a OXPt incorporadas em nanopartículas de quitosana induzem mais a morte celular por apoptose quando comparado com aplicação da OXPt livre. A formulação NP-OXPt apresentou um aumento de morte celular mais intenso quando comparadas ao controle e aos tratamentos OXPt em solução aquosa e as partículas vazias ($p < 0,05$). Provavelmente o fármaco encapsulado em uma concentração superior à 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ exerce uma influência na morte celular por apoptose quando comparado aos outros tratamentos em concentrações menores.

Para se correlacionar estes resultados com os dos ensaios de permeação, deve-se considerar que a mucosa utilizada tem uma espessura de ~ 1 cm e que portanto 1 cm^2 de área de exposição equivale a 1 cm^3 , que é 1 mL. Assim, independente da condição estudada (OXPt-NP aplicadas passivamente por 1 h ou iontoforéticamente por 2 h) as OXPt-NP liberaram para a mucosa suína entre ~ 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ~ 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OXPt e essas doses seriam suficientes para reduzir a viabilidade celular de tumores de língua (25 – 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.3 Conclusão

As NP-OXPt desenvolvidas apresentaram características de composição, tamanho e potencial zeta que conferiram a elas mucoadesividade, de forma que foram capazes de promover a penetração de altas concentrações do quimioterápico na mucosa oral de suínos se comparado à solução controle, mesmo quando o tratamento *ex vivo* foi realizado com sucessivas “lavagens” da formulação para simular o fluxo salivar. Além disso, a aplicação da iontoforese permitiu uma maior penetração do fármaco na mucosa oral. O fármaco tanto em sua forma

encapsulada como livre foi capaz de inibir o crescimento da linhagem SSC-9 do câncer de língua em concentrações acima de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o principal mecanismo de morte celular ocasionado parece ser o de apoptose. Dessa forma, as NP-OXPt parecem ser uma alternativa promissora como método adjuvante no tratamento dos cânceres da cavidade oral.

4.4 Referências

1. Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. L. e Alonso, M. J. Novel hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, p.125-132, 1997.
2. Matos, B. N.; Reis, T. A.; Gratieri, T.; Gelfuso, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *International Journal of Biological Macromolecules*.v.9, n.75 p.225, 2014.
3. Matos, B. N.; Oliveira, P. M.; Reis, T. A; Gratieri, T.; Cunha-Filho, M.; Gelfuso, G. M. Development and Validation of a Simple and Selective Analytical HPLC Method for the Quantification of Oxaliplatin. v. 2015, 2015.
4. Kachnic, L. A.; Li, L.; Fournier, L.; Willers, H. Fanconi anemia pathway heterogeneity revealed by cisplatin and oxaliplatin treatments. *Cancer Lett.* v.1, n.292, p.9-73, 2010.
5. Kandra, P.; Kalangi, H. P. J. Current understanding of synergistic interplay of chitosan nanoparticles and anticancer drugs: merits and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*.v.99, p. 2055-2064, 2015.
6. Aruna, U.; Rajalakshmi, R.; Muzib, I. Y.; Vinesha, V.; Sushma, M.; Vandana, K. R.; Kumar. V. N. Role of chitosan nanoparticles in câncer therapy. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Research*.v.4, n.3, p.318-324, 2013.
7. Elgadir, M. A.; Uddin, Md. S.; Ferdous, S.; Adam, A.; Chowdhury. A. J. K.; Sarker, Md. Z. I. Impact f chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. *Journal of Food and Drug Analysis.* v. XXX, p.1-11, 2014.

8. ANVISA, BRASIL. RDC N° 27 de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, 2012.
9. Fan, W.; Yan, W.; Xu, Z. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. v. 90, p.7-21, 2012.
10. Vrignaud, S.; Benoit, Jean-Pierre; Saulnier, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrofolic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials*. v.32, p.8593-8604, 2011.
11. Wang, J. J.; Zeng, Z. W.; Xiao, R. z.; Xie, T.; Zhou, G. L.; Zhan, X. R.; Wang, S. L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*. v. 6, p. 765-774, 2011.
12. Li, F. B.; Li, J.; Wen, X. Anti-tumour activity of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles: An in vitro study. *Material Science and Engineering*. v. 29, n.8, p. 486-493, 2008.
13. Jain, A.; Sanjay, MPharm; Jain, S. K.; Ganesh, N.; Barve, J.; Beg, A. M. Design and development of ligand-appended polysaccharidicnanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. v. 6, p. 179-190, 2010.
14. Vivek, R.; Thangam, R.; Nipunbabu, V.; Ponraj, T.; Kannan, S. Oxaliplatin-chitosan nanoparticles induced intrinsic apoptotic signaling pathway: A “smart” drug delivery system to breast cancer cell therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*.v.65, p. 289-297, 2014.
15. Nagpal, K.; Singh, S. K.; Mishra, D. N. Chitosan Nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. v.58, n.11, p. 1423-1430, 2010.
16. Frazen, U.; Tam, T. T. N.; Nguyen, C. V.; Bente, G.; JesperØstergaard. Characterization of a liposome-based formulation of oxaliplatin using capillary

electrophoresis: Encapsulation and leakage. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 55, p. 16-22, 2011.

17. Screnci, D.; Mckeage, M. J.; Galettis, P.; Hambley, T. W.; Palmer, B. D.; Baguley, B. C. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. *British Journal Cancer*. v.82, n.4, p. 966-972, 2000.

18. Kasim, N. A.; Whitehouse, M.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Lennernas, H.; Hussain, A. S.; Junginger, H. E.; Stavchansky, S. A.; Midha, K.; Shah, V. P.; Amidon, G. L. *Molecular Pharmacology*. v.1, n.85, 2004.

19. Jonassen, H.; KjØniksen, A. L.; Hiorth, M. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 11, p. 3747-3756, 2012.

20. Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Quimica Nova*. v.26, n.5, p.726-737, 2003.

21. Chhonke, Y. S. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 72, p. 1451–1458, 2015.

22. Chang, E.H. Nanomedicine: past, present and future—a global perspective. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 468, n. 3, p. 511-517, 2015.

23. Maeda, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 91, p. 3-6, 2015.

24. Shi, J. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*. v. 17, n. 1, p. 20-37, 2017.

25. Menchicchi, B., Hensel, A., Goycoolea, F. M.. Polysaccharides as Bacterial Antiadhesive Agents and "Smart" Constituents for Improved Drug Delivery Systems against *Helicobacter pylori* Infection. *Current Pharmaceutical Design*, v.21, p.4888-4906, 2015.
26. Rasso, G., Soddu, E., Cossu, M., Gavini, E., Giunchedi, P., Dalpiaz, A. Particulate formulations based on chitosan for nose-to-brain delivery of drugs. A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32, Part B, 77-87, 2016
27. Chuah, L. H. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 116, p. 228-236, 2014.
28. Al-Kassas, R., Wen, J., Cheng, A. E.-M., Kim, A. M.-J., Liu, S.S.M., Yu, J., Transdermal delivery of propranolol hydrochloride through chitosan nanoparticles dispersed in mucoadhesive gel. *Carbohydrate Polymers*, 153, 176-186, 2016.
29. Abdel-Hafez, S. M.; Hathout, R. M.; Sammour, O. A. Tracking the transdermal penetration pathways of optimized curcumin chitosan nanoparticles via confocal laser scanning microscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017.
30. Gratieri, T.; Gelfuso, G.; Lopez, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quimica Nova*. v.31, n.6, pp.1490-1498, 2008.
31. Kalia, Y. N. Iontophoretic drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. v. 56, n. 5, p. 619-658, 2004.
32. Reis, Thaiene Avila. Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo fluconazol nanoencapsulado para o tratamento de candidíase vulvovaginal. xiii, 65 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
33. Sá, Fernando Augusto Pires de Desenvolvimento e caracterização de lipossomas mucoadesivos para liberação ocular de fármacos. 2015. 77 f., il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

34. Matos, Breno Noronha. Desenvolvimento de uma formulação tópica contendo nanopartículas de quitosana como estratégia para aumentar a penetração folicular do minoxidil sulfato no tratamento da alopecia androgênica. 2014. ix, 56 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

35. Franz-Montan, M.; Baroni, D.; Brunetto, G.; Sobral, V. R. V.; da Silva, C. M. G.; Venâncio, P. Zago, P. W.; Cereda, C. M. S.; Volpato, M. C.; de Araújo, R. D; de Paula, E.; Groppo, F. C. Liposomal lidocaine gel for topical use at the oral mucosa: characterization, in vitro assays and in vivo anesthetic efficacy in humans. *Journal of liposome research*. v.25, n.1, p. 11-19, 2015.

36. Gratieri, T. e Kalia, Y. N. Targeted local simultaneous iontophoresis of chemotherapeutics for topical therapy of head and neck cancers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.460, p.24–27, 2014.

37. He, H.; Haihua, X.; Huihui, K.; Zhigang, X; Xuesi, C; Xiabin, J; Yubin, H. Synthesis of mesoporous sílica nanoparticle–oxaliplatin conjugate for improved anticancer drug delivery *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v.117, p.75–81, 2014.

38. Da, Z.; Jianqiang, Z.; Kunming, J.; Ke, L.; Yangwei, C.; Shaoping, P.; Yi, J.; Jun, L. Preparation, characterisation and antitumour activity of b-, c- and HP-b-cyclodextrin inclusion complexes of oxaliplatin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. v.152, p.501–508, 2016.

39. X, Wang; M, L.; J, W.; Chung-Man, Y.; Hongquan, Z.; Hsiang-fu, K.; Bo, J.; Marie, C. L. The BH3-only protein, PUMA, is involved in oxaliplatin-induced apoptosis in colon cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. v.71, p.1540–1550, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O método CLAE validado nesse trabalho mostrou-se seletivo para a quantificação da OXPt em formulações farmacêuticas, principalmente, frente à polímeros mucoadesivos.

Os estudos de análise térmica forneceram informações importantes para auxiliar no desenvolvimento de sistemas farmacêuticos inovadores e mucoadesivos contendo OXPt. Estudos térmicos juntamente com estudos de caracterização físico-química mostraram que a OXPt é estável em condições normais de produção farmacêutica que envolvem aquecimento e incidência de luz. Além disso, o fármaco mostrou-se compatível com os polímeros QBPM, POLOX e PLGA, que são relevantes para a produção de matrizes de sistemas de liberação modificada.

Os estudos de mucoadesão e, principalmente, o estudo de permeação aqui denominado de permeação dinâmica, confirmaram o potencial mucoadesivo das NP-OPXt desenvolvidas. Logo, as NP-OXPt parecem ser uma alternativa promissora no tratamento dos cânceres orais, principalmente pela mucoadesividade das nanopartículas poder assegurar uma prolongada exposição do fármaco na mucosa oral, permitindo assim, uma maior acumulação do fármaco no tumor.

As perspectivas futuras desse trabalho seriam a realização de estudos pré-clínicos para avaliação da eficácia da formulação em uma situação *in vivo*. Um modelo animal para tumor oral poderia ser inicialmente padronizado e após submetido ao tratamento com a formulação desenvolvido. O sucesso deste tipo de experimento então poderia resultar na possibilidade de se realizarem estudos clínicos.

ANEXO 1**TRABALHOS PUBLICADOS ORIGINADOS DA TESE**

[1] **Matos, B. N.**; Oliveira, P. M.; Reis, T. A; Gratieri, T.; Cunha-Filho, M.; Gelfuso, G. M. Development and Validation of a Simple and Selective Analytical HPLC Method for the Quantification of Oxaliplatin. *Journal of Chemistry*, v. 2015, 2015.

[2] Reis, T. A.; **Matos, B. N.**; Lima, E. M.; Chaker, J. A.; Gratieri, T.; Cunha-Filho, M. S. S.; Gelfuso, G. M. Oxaliplatin preformulation studies for the development of innovative topical drug delivery systems. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, p. 1-11, 2017.