

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
Faculdade de Ciências da Saúde

**Seila Tolentino**

**FILMES BIOADESIVOS CARREGADOS COM CURCUMINA PARA O  
TRATAMENTO TÓPICO DE TUMORES ORAIS E CUTÂNEOS**

Brasília

2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
Faculdade de Ciências da Saúde

**Seila Tolentino**

**FILMES BIOADESIVOS CARREGADOS COM CURCUMINA PARA O  
TRATAMENTO TÓPICO DE TUMORES ORAIS E CUTÂNEOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção  
do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Brasília

2024

## **Seila Tolentino**

Filmes bioadesivos carregados com curcumina para o tratamento tópico de tumores orais e cutâneos

### **Banca examinadora**

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

Universidade de Brasília (UnB)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Pérola de Oliveira Magalhaes Dias Batista

Universidade de Brasília (UnB)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rúbia Casagrande

Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dr. Luiz Carlos Klein Júnior

Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI)

Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho (Suplente)

Universidade de Brasília (UnB)

*Dedico esta tese aos meus amados pais e irmãos, pela força, coragem e exemplo.*

## AGRADECIMENTOS

À educação pública que possibilitou minha trajetória até aqui, desde a escola rural no município de Caturai/GO (Escola Municipal Domingos Sanje Anabuki), onde fui alfabetizada, passando pelo Colégio Estadual Moisés Santana, Colégio Estadual Manoel Vilaverde, Universidade Estadual de Goiás e por fim pela Universidade de Brasília, que por meio do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) forneceu uma excelente estrutura e profissionais para a realização desta pesquisa.

Ao Governo Federal e ao Ministério da Saúde por possibilitar a capacitação de seus servidores, entendendo a importância do estudo e da ciência para o desenvolvimento do País. Aos colegas que supriram a minha ausência nesse período, especialmente aos colegas Zênia Maria Maciel (grande incentivadora), Daiane dos Santos, Máira Carneiro, Kleber Vânio, Maria José, Adriana Silva, Sacha Aquino, Carlos Alberto Aguilera, Glauco, Ricardo e aqueles que já seguiram outros caminhos, mas estiveram presentes durante esse processo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso, por me acolher e me guiar nessa trajetória. Pelo exemplo como professor, orientador e cidadão. Pelo esforço, juntamente com os demais professores Prof. Dr. Marcílio, Prof. Dr<sup>a</sup>. Taís Gratieri, em fornecer todos os recursos materiais e intelectuais para a nossa pesquisa. Tenho muito orgulho em fazer parte desse grupo e especialmente em ser sua aluna.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliete Neves Silva Guerra e demais pesquisadores do Laboratório de Histopatologia Bucal Departamento de Odontologia da Universidade de Brasília (Mylene, Lídia, Bruna, Larissa, Quele) por me acolher e ajudar prontamente durante o tempo em que estive realizando meus experimentos no referido laboratório.

Aos colegas de laboratório Geisa, Rayssa, Danilo, Jaya, Thamires, Venâncio, Ana Clara, Pedro, Ana Luisa, Idejan pela leveza em ajudar e ensinar e em especial aos “irmãos científicos” Camila, Marianne, Breno, Lucas, Mikaella e Luma pelo apoio, ajuda, carinho e força. Agradeço também aqueles que já passaram pelo laboratório e deixaram sua enorme contribuição, em especial, Máira Nunes que me acolheu com tanto carinho.

Aos amigos e familiares que permaneceram comigo até aqui pela compreensão, carinho e ouvidos dispostos a escutar e em especial à minha amiga e prima Anna Claudia, por me ajudar a viver de uma forma mais leve e feliz.

Aos meus amados pais, que apesar de toda dificuldade e pouca escolaridade, acreditaram que o estudo poderia mudar as nossas vidas. A minha mãe, Luzia, fonte de toda força, amor e dedicação que carrego em minha vida. Ao meu pai, Valter, que com certeza estaria me incentivando se não tivesse partido tão cedo. À minha doce tia Zequinha, dona do amor mais puro desse mundo. Ao meu irmão, Ledison, que ajudou quando pequenas coisas significavam tanto e em especial a minha irmã Selma, desbravadora de sonhos. Você, Selma, acreditou que as mãos calejadas e cheias de espinhos seriam capazes manusear sonhos mais altos. Você abriu portas para tantos.

À minha amada Belinha, companhia fiel de todos as horas.

E por fim e mais importante, à Deus, que me reergueu e me deu forças para continuar.

**“Na vida tudo passa”  
(Minha mãe)**

## RESUMO

A curcumina é uma substância de origem natural encontrada no rizoma da *Curcuma longa* que tem sido proposta para o tratamento de vários tipos de câncer. No entanto, a curcumina apresenta algumas desvantagens que impactam sua farmacocinética, como baixa hidrossolubilidade e sensibilidade ao pH fisiológico. Assim, no caso de tumores superficiais, como câncer oral e melanomas, seu uso tópico seria uma alternativa promissora para liberação do fármaco diretamente para o seu local de ação. Considerando a dificuldade que um fármaco lipofílico deve ter para penetrar pele e mucosa, o presente estudo propõe o desenvolvimento de filmes bioadesivos contendo curcumina como uma alternativa para o tratamento tópico de tumores de pele e oral. Primeiramente, desenvolveu-se um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência capaz de quantificar a curcumina recuperada da pele e mucosa oral. O método foi capaz de dosar a curcumina das referidas matrizes biológicas e provou ser adequado considerando todos os parâmetros de validação avaliados. A compatibilidade química entre o fármaco e os excipientes da formulação foi demonstrada usando técnicas de análise térmica. Então, foram desenvolvidos e selecionados três filmes contendo quitosana, álcool polivinílico, Poloxamer<sup>®</sup>407 e propilenoglicol (FA-5, FC-5 e FD-5), que foram caracterizados considerando-se aspecto, peso, espessura, resistência à dobradura, pH, teor de curcumina, índice de intumescimento, força de ruptura, mucoadesividade e morfologia. Os filmes apresentaram aspecto liso, foram flexíveis, livres de bolhas, rachaduras ou precipitados, com uniformidade de peso e espessura. Apresentaram pH compatível com os locais de aplicação (de 5,2 a 5,5), foram resistentes à dobradura e o doseamento ficou bem próximo à concentração teórica (78,6 µg/cm<sup>2</sup>) de curcumina. Apresentaram resistência à tração e intumescimento necessários para garantir mucoadesividade e liberação do fármaco. A análise morfológica reforçou a formação da estrutura compatível com o sistema proposto e ainda elucidou pequenas diferenças entre as formulações. O estudo de estabilidade demonstrou manutenção de parâmetros como aspecto, espessura, pH e teor durante o período do experimento (90 dias) em temperatura ambiente. A liberação do fármaco em meio fisiológico foi determinada *in vitro* durante 24 h. Todos os filmes controlaram a liberação de curcumina nas primeiras 8 h, com 51,6 ± 4,8%, 65,6 ± 13,0% e 55,2 ± 11,2%, do fármaco liberado, para os filmes FA-5, FC-5 e FD-5, respectivamente. Os estudos de penetração *in vitro* mostraram que todos os filmes desenvolvidos aumentaram significativamente (p<0,05) a penetração da curcumina na mucosa (permeação estática: 14,2 ± 3,1 µg/cm<sup>2</sup>, 7,5 ± 1,0 µg/cm<sup>2</sup> e 8,2 ± 0,8 µg/cm<sup>2</sup>, permeação dinâmica: 1,6 ± 0,1 µg/cm<sup>2</sup>, 1,6 ± 0,4 µg/cm<sup>2</sup> e 1,9 ± 0,1 µg/cm<sup>2</sup> para os filmes FA-5, FC-5 e FD-5, respectivamente) em comparação ao controle contendo curcumina em solução, que não penetrou a mucosa em quantidades quantificáveis. Em relação à pele, os filmes também promoveram a permeação em quantidades quantificáveis (estrato córneo: 1,9 ± 0,8 µg/cm<sup>2</sup>, 1,4 ± 0,1 µg/cm<sup>2</sup> e 1,3 ± 0,1 µg/cm<sup>2</sup>; pele remanescente: 2,7 ± 0,2 µg/cm<sup>2</sup>, 2,3 ± 0,4 µg/cm<sup>2</sup> e 1,7 ± 0,1 µg/cm<sup>2</sup>). Os ensaios de citotoxicidade realizados em 3 tipos de células tumorais (FaDu, SCC-9 e MeWo) e saudável (HaCaT) demonstraram atividade citotóxica da curcumina em doses próximas àquelas encontradas no ensaio de permeação e a avaliação em associação com radioterapia demonstrou que no tratamento com dosagens únicas de 4, 8 e 12Gy a radioterapia seria desnecessária. Por fim, o teste de irritação provou que os filmes são seguros para a aplicação tópica. Assim, os filmes desenvolvidos devem representar uma alternativa promissora para o tratamento tópico de tumores orais e cutâneos utilizando a curcumina.

**Palavras-chave:** câncer, filme mucoadesivo, pele, quitosana.

## ABSTRACT

Curcumin is a substance of natural origin found in the rhizome of *Curcuma longa* that has been proposed for treating several types of cancer. However, curcumin has some disadvantages that impact its pharmacokinetics, such as low aqueous solubility and sensitivity to physiological pH. Thus, in the case of superficial tumors, such as oral cancer and melanoma, its topical use would be a promising alternative for releasing the drug directly to its site of action. Considering the difficulty that a lipophilic drug must have in penetrating the skin and mucosa, the present study proposes the development of bioadhesive films containing curcumin as an alternative for the topical treatment of skin and oral tumors. First, an analytical method was developed using high-performance liquid chromatography capable of quantifying curcumin recovered from the skin and oral mucosa. The method could measure curcumin from the biological matrices and proved adequate considering all the validation parameters evaluated. The chemical compatibility between the drug and the formulation excipients was demonstrated using thermal analysis techniques. Then, three films containing chitosan, polyvinyl alcohol, Poloxamer<sup>®</sup>407, and propylene glycol (namely, FA-5, FC-5, and FD-5) were developed and selected, which were characterized considering aspect, weight, thickness, bending resistance, pH, curcumin content, swelling index, rupture force, mucoadhesiveness and morphology. The films had a smooth appearance, were flexible, free of bubbles, cracks, or precipitates, with uniform weight and thickness. They have a pH compatible with the application sites (from 5.2 to 5.5), were resistant to folding, and the dosage was very close to the theoretical concentration ( $78.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) of curcumin. They presented tensile strength and swelling necessary to guarantee mucoadhesion and drug release. The morphological analysis reinforced the formation of the structure compatible with the proposed system and elucidated small differences between the formulations. The stability study demonstrated the maintenance of parameters such as appearance, thickness, pH, and content during the experiment (90 days) at room temperature. Drug release in physiological media was determined in vitro for 24 h. All films controlled the release of curcumin in the first 8 h, with  $51.6 \pm 4.8\%$ ,  $65.6 \pm 13.0\%$ , and  $55.2 \pm 11.2\%$  of the drug released for the FA- films. 5, FC-5 and FD-5, respectively. In vitro penetration studies showed that all developed films significantly increased ( $p < 0.05$ ) the penetration of curcumin into the mucosa (static permeation:  $14.2 \pm 3.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $7.5 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , and  $8.2 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , dynamic permeation:  $1.6 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $1.6 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , and  $1.9 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  for the FA-5, FC-5, and FD-5 films, respectively) compared to the control containing curcumin in solution, which did not penetrate the mucosa in quantifiable amounts. About the skin, the films also promoted permeation in quantifiable amounts (stratum corneum:  $1.9 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , and  $1.3 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; remaining skin:  $2.7 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $2.3 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , and  $1.7 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Cytotoxicity tests carried out on three types of tumor cells (FaDu, SCC-9, and MeWo) and healthy cells (HaCaT) demonstrated cytotoxic activity of curcumin at doses close to those found in the permeation test. The evaluation in association with radiotherapy demonstrated that the treatment with single doses of 4, 8, and 12 Gy radiotherapy would be unnecessary. Finally, the irritation test proved that the films are safe for topical application. Therefore, the films developed should represent a promising alternative for the topical treatment of oral and skin tumors using curcumin.

**Keywords:** Cancer; Mucoadhesive film; Skin; Chitosan.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura morfológica da mucosa bucal. Fonte: Autoria própria .....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo das vias de permeação do fármaco na mucosa bucal. (a) via paracelular, (b) via transcelular. Fonte: Autoria própria. ....	6
<b>Figura 3.</b> Estrutura da epiderme. Fonte: Autoria própria. ....	7
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo das vias de permeação do fármaco na pele. (a) via paracelular, (b) rotas alternativas e (c) via transcelular. Fonte: Autoria própria. ....	9
<b>Figura 5.</b> (a) Carcinoma de células escamosas no rebordo alveolar, (b) carcinoma de células escamosas na gengiva. Fonte: Adaptado de Bagan et al (2010) (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). ....	12
<b>Figura 6.</b> (a) Carcinoma basocelular, (b) carcinoma espinocelular, (c) melanoma. Fonte: Adaptado de Craythorne et al (2017) (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017). ....	14
<b>Figura 7.</b> Rizoma da <i>Curcuma longa</i> . Fonte: Autoria própria. ....	19
<b>Figura 8.</b> Fórmula estrutural da curcumina. a) forma ceto, b) forma enol. ....	20
<b>Figura 9.</b> a) curcumina; b) produtos de degradação resultante da hidrólise (i) ácido ferúlico, (ii) vanilina, (iii) feruloilmetano; c) produto de degradação resultante da auto-oxidação: biciclopentadiona. ....	21
<b>Figura 10.</b> Fases da bioadesão. Fonte: Autoria própria. ....	24
<b>Figura 11.</b> Fórmula estrutural da quitosana. ....	25
<b>Figura 12.</b> Fórmula estrutural do PVA. ....	26
<b>Figura 13.</b> Fórmula estrutural do Poloxamer <sup>®</sup> 407. ....	27
<b>Figura 14.</b> Processo de remoção da pele (a) e mucosa bucal (b) de suínos. ....	29
<b>Figura 15.</b> Representação técnica do método de extração aplicado à pele remanescente e mucosa para a recuperação da curcumina nesses tecidos. Fonte: Autoria própria. ....	34
<b>Figura 16.</b> Representação técnica do método de extração aplicado ao estrato córneo para a recuperação da curcumina. Fonte: autoria própria. ....	34
<b>Figura 17.</b> Representação técnica do preparo dos filmes contendo curcumina. Fonte: autoria própria. ....	39
<b>Figura 18.</b> Representação do ensaio de intumescimento dos filmes. ....	41
<b>Figura 19.</b> Módulo de força de tração do texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems) no momento da análise dos filmes desenvolvidos. ....	42
<b>Figura 20.</b> Módulo de mucoadesividade do texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems). (a) momento de contato entre o disco de mucina e o filme. (b) momento de deslocamento do disco de mucina. ....	43
<b>Figura 21.</b> Sistema de difusão Phoenix DB-6 (Teledyne Hanson). ....	44
<b>Figura 22.</b> Célula de difusão e seus componentes. ....	44
<b>Figura 23.</b> Célula de difusão de Franz modificada. (a) compartimento receptor, (b) compartimento doador e (c) compartimento doador e receptor separado pelo tecido que será utilizado no experimento (pele ou mucosa). ....	46
<b>Figura 24.</b> Permeação dinâmica em mucosa de suínos. a) Mucosa e gancho utilizado para manter a mucosa suspensa durante o experimento, b) Filme aplicado à mucosa, c) Mucosas suínas suspensas, com filmes aplicados, aguardando a aplicação de saliva artificial. ....	47
<b>Figura 25.</b> Cultura celulares utilizadas para o ensaio de viabilidade celular. ....	48
<b>Figura 26.</b> Esquema do ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular. ....	49

<b>Figura 27.</b> Planejamento utilizado para realização da curva dose-resposta da curcumina nas linhagens celulares HaCaT, FaDu, SCC-9 e MeWo.....	49
<b>Figura 28.</b> Desenho esquemático do ensaio de HET-CAM. ....	52
<b>Figura 29.</b> A influência dos tempos de extração, sob agitação constante, para a recuperação da curcumina a partir do estrato córneo. Os dados estão representados pela média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Análise estatística por ANOVA para amostras independentes. (***) $p \leq 0,001$ . ....	55
<b>Figura 30.</b> Variação dos parâmetros do método de extração da curcumina. (a) influência de diferentes extratores sob condição de agitação constante e tempo de extração para a recuperação da curcumina a partir da pele remanescente. (b) influência dos tempos de extração. Os dados estão representados pela média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Análise estatística por ANOVA para amostras independentes. (*) $p \leq 0,05$ ; (**) $p \leq 0,01$ ; (***) $p \leq 0,001$ e (****) $p \leq 0,0001$ . ....	56
<b>Figura 31.</b> (a) cromatogramas de CLAE-UV representativos de curcumina (padrão (PD) e matéria-prima (MP)), estrato córneo (EC), pele remanescente (PR) e mucosa oral (MUC) obtidos de acordo com o método estabelecido, com detecção do fármaco em 424 nm. (b) análise em termos de áreas de pico do fármaco isolado e adicionado aos extratos da pele e mucosa. (c) análise em termos de tempo de retenção do fármaco isolado e adicionado aos extratos da pele e mucosa. ....	58
<b>Figura 32.</b> Estabilidade da solução de curcumina em diferentes meios, considerando o tempo inicial, 6 h e 24 h após o preparo da solução. ....	64
<b>Figura 33.</b> Análises de DSC da curcumina, demais componentes dos filmes isolados e suas misturas físicas. Taxa de aquecimento 10 °C/min de 25 a 200 °C sob amostra controlada de nitrogênio. Onde CUR: curcumina, P407: Poloxamer <sup>®</sup> 407, PPG: propilenoglicol, PVA: álcool polivinílico, QS: quitosana. ....	66
<b>Figura 34.</b> Primeira derivada de análises termogravimétricas (DrTGA) de curcumina e mistura física dos componentes dos filmes (M1 a M7) e perfil teórico obtido dos compostos individuais. Cada evento de perda de massa é indicado na forma de porcentagem (%). ....	67
<b>Figura 35.</b> Filmes de curcumina produzidos pela técnica de evaporação do solvente a uma concentração de 157,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Onde FA-10: CUR + QS + PPG + PVA; FB-10: CUR + P407 + PPG + PVA; FC-10: CUR + QS + P407 + PVA; FD-10: CUR + QS + P407 + PPG + PVA; FE-10: CUR + QS + P407 + PPG. ....	69
<b>Figura 36.</b> Filmes de curcumina produzidos pela técnica de evaporação do solvente a uma concentração de 31,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (FA-2, FB-2, FC-2 e FD-2) e 78,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (FA-5, FC-5 e FD-5), além de filmes produzidos sem o fármaco (branco FA, branco FB, branco FC e branco FD). ....	70
<b>Figura 37.</b> Representação gráfica dos resultados de força de ruptura, realizados por meio de texturômetro. Os dados estão representados pela média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Análise estatística por ANOVA para amostras independentes. (*) $p \leq 0,05$ ; (**) $p \leq 0,01$ ; (***) $p \leq 0,001$ e (****) $p \leq 0,0001$ . ....	72
<b>Figura 38.</b> Representação gráfica dos resultados de mucoadesividade, realizados por meio de texturômetro. (a) comparativo da mucoadesividade entre os filmes previamente umectados. (b) comparativo da mucoadesividade entre filmes secos e umectados a partir das mesmas formulações. Os dados estão representados pela média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Análise estatística por ANOVA para amostras independentes. (*) $p \leq 0,05$ ; (**) $p \leq 0,01$ ; (***) $p \leq 0,001$ e (****) $p \leq 0,0001$ . ....	73
<b>Figura 39.</b> Microscopia eletrônica de varredura dos filmes, em corte transversal. (a) filme FA-5 contendo o fármaco, (b) filme FC-5 contendo o fármaco, (c) filme FD-5 contendo o fármaco, (d) filme FA-5 sem o fármaco, filme FC-5 sem o fármaco e (f) filme FD-5 sem o fármaco. Aumento das imagens: 5000 $\times$ . ....	74
<b>Figura 40.</b> Imagens capturadas dos filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) em cada um dos tempos predefinidos para o estudo de estabilidade (0, 7, 30, 60 e 90 dias), para as duas condições de armazenamento (temperatura ambiente e 40 °C). ....	76

<b>Figura 41.</b> Variação de teor de curcumina dos filmes FA-5 (a), FC-5 (b) e FD-5 (c) em temperatura ambiente e 40 °C. Os dados representam média de 3 determinações ± desvio padrão. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes em comparação a análise inicial de cada condição (p≤0,05).....	77
<b>Figura 42.</b> Perfil de liberação da curcumina a partir dos filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) no período de 24 h, com coletas em 1, 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 e 24 h e registro fotográfico dos filmes ao final do ensaio. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes em comparação para cada ponto de coleta (p<0,05). .....	79
<b>Figura 43.</b> Curcumina recuperada da pele (µg/cm <sup>2</sup> ) após 24 h de permeação estática dos filmes em comparação ao controle. (a) Estrato córneo, (b) pele remanescente. Os dados representam média de 5 determinações ± desvio padrão. # = valores abaixo de limite de quantificação. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (*) p≤0,05; (**) p≤ 0,01; (***) p≤0,001 e (****) p≤0,0001. ....	81
<b>Figura 44.</b> Curcumina recuperada da mucosa (µg/cm <sup>2</sup> ) após 24 h de permeação estática dos filmes em comparação ao controle. Os dados representam média de 5 determinações ± desvio padrão. # = abaixo de limite de quantificação. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (*) p≤0,05; (**) p≤ 0,01; (***) p≤0,001 e (****) p≤0,0001.....	82
<b>Figura 45.</b> Curcumina recuperada da mucosa (µg/cm <sup>2</sup> ) após 12 h de permeação dinâmica em comparação ao controle. Os dados representam média de 5 determinações ± desvio padrão. # = abaixo de limite de quantificação. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (*) p≤0,05; (**) p≤ 0,01; (***) p≤0,001 e (****) p≤0,0001.....	83
<b>Figura 46.</b> Comparação da quantidade de curcumina recuperada após aplicação de protocolo estático e dinâmico à mucosa suína. Os dados representam média de 5 determinações ± desvio padrão. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (*) p≤0,05; (**) p≤ 0,01; (***) p≤0,001 e (****) p≤0,0001.....	84
<b>Figura 47.</b> Efeito da curcumina na viabilidade das linhagens celulares HaCaT, FaDu, SCC-9 e MeWo. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para os dados de viabilidade celular e também a IC <sub>50</sub> foram calculados após a regressão não linear nas curvas dose-resposta. Os dados estão representados pela média ± desvio padrão (n = 9). (a) e (b) referem-se à linhagem HaCaT, (c) e (d) referem-se à linhagem FaDu, (e) e (f) referem-se à linhagem SCC-9 e (g) e (h) referem-se a linhagem MeWo. ....	86
<b>Figura 48.</b> Efeito da curcumina na viabilidade das linhagens celulares HaCaT (a), FaDu (b), SCC-9 (c) e MeWo (d) associada ou não a 3 três dosagens diferentes de radioterapia. Os dados estão representados pela média ± desvio padrão (n = 9). Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (*) p ≤ 0,05; (**) p ≤ 0,01; (***) p ≤ 0,001 e (****) p ≤ 0,0001 .....	89
<b>Figura 49.</b> Sequência ilustrativa dos registros fotográficos realizados durante o ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito com controle positivo (NaOH 1,0 mol/L), controle negativo (PBS), e solução contendo cada um dos filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) solubilizado em água na membrana cório-alantoide após 30s, 2 min e 5 min da aplicação.....	91
<b>Figura 50.</b> Efeito da quitosana na viabilidade da linhagem celular HaCaT. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para os dados de viabilidade celular. Devido à manutenção da viabilidade celular não foi possível calcular a IC <sub>50</sub> a partir da curva dose-resposta obtida. Os dados estão representados pela média ± desvio padrão (n = 9). .....	93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição das misturas físicas da curcumina e dos demais componentes dos filmes para realização do estudo de compatibilidade. ....	36
<b>Tabela 2.</b> Proporção dos constituintes dos filmes. ....	38
<b>Tabela 3.</b> Índice para classificação quanto ao grau de irritabilidade.....	52
<b>Tabela 4.</b> Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento do método CLAE-UV para quantificação da curcumina. ....	54
<b>Tabela 5.</b> Demonstração experimental do limite de quantificação (LQ) do método cromatográfico para análise de curcumina. ....	58
<b>Tabela 6.</b> Resultados dos testes de precisão para determinação da curcumina. CV = coeficiente de variação. ....	60
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos para recuperação da curcumina a partir do estrato córneo, pele remanescente e mucosa oral, em três concentrações diferentes (2,5, 7,5 e 30,0 µg/mL). ....	61
<b>Tabela 8.</b> Resultados da robustez a partir de desafios em relação a temperatura do forno, proporção da fase móvel, vazão da fase móvel e pH da fase móvel.....	62
<b>Tabela 9.</b> Solubilidade da curcumina em diferentes meios. Resultados apresentados como média ± DP; n=3 .....	63
<b>Tabela 10.</b> Demonstração da perda de massa (%) dos componentes isolados da formulação e a respectiva faixa de temperatura da ocorrência do evento. ....	68
<b>Tabela 11.</b> Caracterização dos filmes produzidos a partir da técnica de evaporação de solvente na concentração de 78,6 µg/cm <sup>2</sup> . ....	71
<b>Tabela 12.</b> Resultados relacionados ao perfil de intumescimento dos filmes de curcumina .....	72
<b>Tabela 13.</b> Resultados de estabilidade referentes aos testes de teor, espessura e pH dos filmes FA-5, FC-5 e FD-5, nos tempos de 0, 7, 30, 60 e 90 dias em temperatura ambiente e 40° C. Resultados representados por triplicata ± DP. ....	77
<b>Tabela 14.</b> Valores de regressão (r <sup>2</sup> ) obtidos pelo cálculo matemático dos modelos de ordem zero, modelo de Higuchi, primeira ordem, Weibull e Hixson Crowell .....	80
<b>Tabela 15.</b> Índice de irritabilidade encontrado após aplicação do teste de HET-CAM para controle positivo, controle negativo e filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) e sua respectiva classificação. Resultados representados com média (n=3) ± DP. ....	92

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<sup>1</sup> CUR*	Curcumina no estado de singlete excitado
<sup>3</sup> CUR*	Curcumina no estado de tripleto excitado
<sup>1</sup> CUR	Curcumina no estado fundamental
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Do inglês, <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
HEPES	Ácido N-2- hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
HPV	Papilomavírus humano
ICH	Do inglês, <i>International Conference on Harmonization</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
PVA	Álcool polivinílico
POP	Polioxipropileno
POE	Polioxietileno
RNA	Ácido ribonucleico
TGA	Análise Termogravimétrica
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1	MUCOSA BUCAL .....	4
<b>3.1.1</b>	<b>Mecanismos de permeação de fármacos através da mucosa</b> .....	<b>5</b>
3.2	PELE .....	6
<b>3.2.1</b>	<b>Mecanismos de permeação de fármacos através da pele</b> .....	<b>8</b>
3.3	CÂNCER .....	9
<b>3.3.1</b>	<b>Câncer de cabeça e pescoço</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Câncer de pele</b> .....	<b>12</b>
3.3.2.1	Carcinomas não melanoma .....	13
3.3.2.2	Melanoma.....	15
<b>3.3.3</b>	<b>Tratamentos</b> .....	<b>15</b>
3.3.3.1	Câncer de boca .....	15
3.3.3.2	Câncer de pele .....	16
3.4	CURCUMINA .....	18
<b>3.4.1</b>	<b>Utilização terapêutica da curcumina</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Aspectos físico-químicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Segurança</b> .....	<b>22</b>
3.5	FILMES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO .....	22
<b>3.5.1</b>	<b>Polímeros utilizados no preparo de filmes</b> .....	<b>25</b>
3.5.1.1	Quitosana .....	25
3.5.1.2	Álcool polivinílico .....	26
3.5.1.3	Poloxamer <sup>®</sup> 407 .....	26
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1	MATERIAL .....	28
<b>4.1.1</b>	<b>Reagentes e insumos</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Obtenção da pele e mucosa de suínos</b> .....	<b>29</b>
4.2	PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE CURCUMINA.....	30
4.3	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO .....	30
<b>4.3.1</b>	<b>Condições cromatográficas</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Preparo de extratos das camadas de pele e de mucosa</b> .....	<b>30</b>

<b>4.3.3</b>	<b>Otimização da extração do fármaco das camadas da pele e mucosa .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Validação da metodologia analítica .....</b>	<b>32</b>
4.3.4.1	Seletividade .....	32
4.3.4.2	Linearidade.....	32
4.3.4.3	LD e LQ .....	32
4.3.4.4	Precisão .....	33
4.3.4.5	Exatidão .....	33
4.3.4.6	Robustez.....	35
4.4	SOLUBILIDADE DA CURCUMINA .....	35
4.5	ESTABILIDADE DA CURCUMINA NOS SOLVENTES.....	35
4.6	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE A CURCUMINA E EXCIPIENTES .....	36
<b>4.6.1</b>	<b>Preparo das amostras.....</b>	<b>36</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Análise termogravimétrica (TGA).....</b>	<b>36</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Calorimetria de varredura diferencial (DSC) .....</b>	<b>37</b>
4.7	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO CURCUMINA .....	37
<b>4.7.1</b>	<b>Obtenção dos filmes .....</b>	<b>37</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Caracterização dos filmes.....</b>	<b>39</b>
4.7.2.1	Aspecto.....	39
4.7.2.2	Peso e espessura .....	40
4.7.2.3	Resistência à dobradura.....	40
4.7.2.4	pH 40	
4.7.2.5	Determinação do conteúdo de curcumina .....	40
4.7.2.6	Índice de intumescimento .....	40
4.7.2.7	Força de ruptura .....	41
4.7.2.8	Mucoadesividade.....	42
4.7.2.9	Morfologia .....	43
4.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE .....	43
4.9	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO DE CURCUMINA A PARTIR DOS FILMES .....	43
4.10	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA.....	45
<b>4.10.1</b>	<b>Ensaio estático .....</b>	<b>45</b>
<b>4.10.2</b>	<b>Ensaio dinâmico em mucosa .....</b>	<b>46</b>
4.11	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR .....	47
<b>4.11.1</b>	<b>Cultura de células.....</b>	<b>47</b>

4.11.2	Avaliação de citotoxicidade .....	48
4.11.3	Avaliação da citotoxicidade da curcumina associada à radioterapia .....	50
4.12	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITATIVO DOS FILMES.....	51
4.12.1	Ensaio <i>in vitro</i> em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados (HET-CAM) .....	51
4.12.2	Viabilidade celular .....	53
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
5.1	ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	54
5.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS FÁRMACOS RETIDOS NAS CAMADAS DA PELE E MUCOSA .....	55
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	57
5.4	SOLUBILIDADE DA CURCUMINA .....	63
5.5	ESTABILIDADE ANALÍTICA DA CURCUMINA.....	64
5.6	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE CURCUMINA E OS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO.....	65
5.7	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO CURCUMINA .....	68
5.8	ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS FILMES.....	75
5.9	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO DE CURCUMINA A PARTIR DOS FILMES .....	78
5.10	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE PERMEAÇÃO .....	80
5.11	VIABILIDADE CELULAR .....	85
5.12	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS FILMES.....	90
5.12.1	HET-CAM.....	90
5.12.2	MTT com a quitosana .....	92
6.	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
7.	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

O câncer é um crescimento desordenado de células anormais de qualquer órgão ou tecido do corpo. É a primeira ou segunda causa principal de morte antes dos 70 anos em 112 de 183 países e ocupa o terceiro ou quarto em mais 23 países. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) por meio da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) foram registrados, em 2022, cerca de 20 milhões de novos casos e 9,7 milhões de mortes (SUNG et al., 2021; WHO, 2022, 2024). O câncer de boca, especificamente, foi responsável por 177.757 óbitos no mundo em 2020, enquanto o câncer de pele não-melanoma é o tumor maligno mais incidente no Brasil, com 31,3% do total de casos (INCA, 2022a). Já o câncer de pele melanoma, apesar de representar apenas 3% das neoplasias malignas incidentes nesse órgão, é o tipo mais grave e letal, devido à alta probabilidade de provocar metástases (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; LEITER; KEIM; GARBE, 2019; INCA, 2022b).

O tratamento desses tumores superficiais que acometem mucosa oral e pele passa pela avaliação de diversos fatores, como localização, estágio, condições do paciente, bem como o desejo de preservação de alguns tecidos e funcionalidades (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; GENDEN et al., 2010). No entanto, mesmo a excisão cirúrgica sendo o padrão para o tratamento desses tumores epiteliais, terapias não cirúrgicas como radioterapia, ou aplicação de agentes quimioterápicos sistêmicos, como metotrexato, cisplatina ou doxorrubicina, são necessárias (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015; CHOUDHARI et al., 2020). Muitos desses tratamentos envolvem altos níveis de toxicidade, resistência medicamentosa e recidivas (CHOUDHARI et al., 2020; SAJADIMAJD et al., 2020). Dessa forma, observa-se a importância do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que sejam mais seguras e efetivas.

Nesse sentido, produtos naturais e seus derivados têm recebido bastante destaque, sendo a origem de muitos medicamentos anticâncer inseridos no mercado nas últimas décadas (SAJADIMAJD et al., 2020). Compostos da classe dos polifenóis estão sendo estudados para esse fim por possuírem ação no controle da metástase de células malignas (JONES; KATIYAR, 2013; SAJADIMAJD et al., 2020). Entre esses fitoquímicos em destaque no tratamento do câncer está a curcumina, que além de apresentar ação contra vários tumores, como melanoma, mama, cabeça e pescoço, próstata e ovário (ALINEZHAD et al., 2017), é também proposta como agente fotossensibilizante na terapia fotodinâmica, que é uma modalidade terapêutica

apesar de mais complexa, mais localizada e menos tóxica desenvolvida para o tratamento de tumores superficiais.

As evidências sugerem que a curcumina possui vários alvos moleculares como fatores de crescimento e seus receptores, fatores de transcrição, citocinas, enzimas e genes que regulam apoptose e a proliferação celular (KUNNUMAKKARA; ANAND; AGGARWAL, 2008; KEYVANI-GHAMSARI; KHORSANDI; GUL, 2020). Ela também atua reduzindo a expressão de proteínas relacionadas à resistência e aumentando o desempenho de outros fármacos antitumorais (KEYVANI-GHAMSARI; KHORSANDI; GUL, 2020).

Apesar das inúmeras evidências em relação à ação terapêutica da curcumina, a baixa solubilidade desse fármaco em água e a sua sensibilidade em pH fisiológico são fatores limitantes para sua utilização (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012). Uma das alternativas para melhorar a sua biodisponibilidade é a utilização de uma via de administração diferente da oral e a proteção do fármaco da degradação e do metabolismo, o que aumenta as chances de atingir o tecido alvo. Este trabalho propõe filmes bioadesivos desenvolvidos para carrear o fármaco e disponibilizá-lo diretamente em seu local de ação, mantendo assim a formulação na superfície biológica acometida pela doença (PATEL; PRAJAPATI; PATEL, 2007; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

Esses filmes bioadesivos são desenvolvidos de forma a possibilitar adesão ao tecido biológico por um longo período, e ainda proporcionando uma liberação controlada e sustentada do fármaco. Características relevantes quando se trata da curcumina, por sua propriedade lipofílica e dificuldade de penetrar nas camadas da pele. Os filmes normalmente são compostos por polímeros biocompatíveis como quitosana, gelatina, álcool polivinílico (PVA) e outros materiais naturais ou sintéticos, que proporcionam a integridade estrutural do filme e influenciam em suas propriedades de adesão.

Assim, pensando no alto potencial terapêutico da curcumina e nos desafios farmacocinéticos desse fármaco, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar filmes bioadesivos carregados com curcumina para evitar a degradação desse fármaco e conferir mais segurança à terapia, na busca de uma alternativa tópica efetiva para o tratamento de tumores orais e de pele.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar filmes bioadesivos carregados com curcumina como alternativa efetiva para o tratamento tópico de tumores orais e de pele.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um método analítico para quantificar a curcumina extraída da mucosa e da pele e padronizar a extração;
- Verificar a compatibilidade entre a curcumina e os componentes utilizados no preparo dos filmes bioadesivos;
- Desenvolver e caracterizar filmes bioadesivos para incorporação de curcumina;
- Avaliar a estabilidade dos sistemas de liberação desenvolvidos;
- Determinar o perfil de liberação da curcumina a partir dos filmes;
- Avaliar *in vitro* a penetração da curcumina na pele e mucosa a partir dos filmes;
- Avaliar *in vitro* a penetração da curcumina na mucosa oral simulando a salivagem;
- Analisar a dose tóxica do fármaco frente a células de carcinoma oral, melanomas e células saudáveis em associação ou não à radioterapia;
- Estudar *in vitro* o potencial irritativo dos filmes.

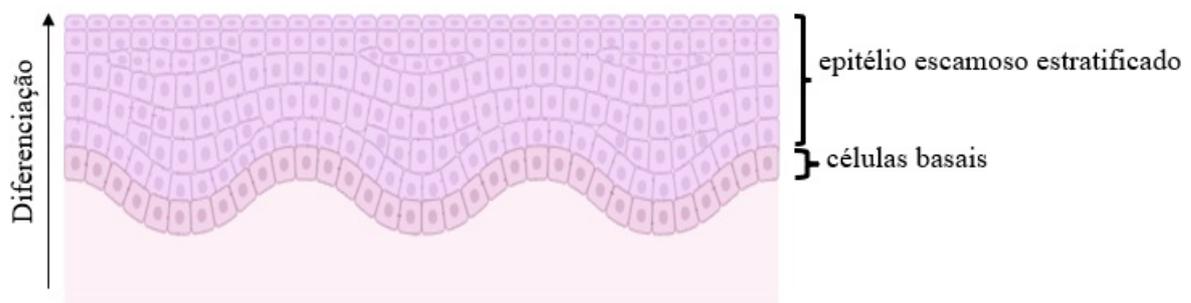
### 3. REVISÃO DA LITERATURA

---

#### 3.1 MUCOSA BUCAL

As mucosas são superfícies úmidas que revestem as cavidades do corpo, como acontece no trato respiratório e gastrointestinal (SMART, 2005). Anatomicamente, a região bucal contém três tipos de mucosa: a mucosa que reveste o vestíbulo oral, a que reveste a região sublingual e a mucosa especializada (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018), cuja principal função é fornecer suporte mecânico à cavidade oral (MORALES; MCCONVILLE, 2011).

Em comparação com a pele, a cavidade oral possui uma área bem menor, de aproximadamente 50 cm<sup>2</sup> (SHOJAEI, 1998; WOODLEY, 2001a). A mucosa bucal é composta pelo epitélio externo e membrana basal (Figura 1). O epitélio da mucosa possui cerca de 40-50 camadas de células e é composto por epitélio escamoso estratificado, semelhante ao encontrado no restante do corpo. Abaixo dele encontra-se uma membrana basal, formada por células basais, que avançam por meio de uma série de diferenciação formando a camada intermediária, rumo às camadas superficiais, onde as células são eliminadas da superfície do epitélio, num tempo de renovação estimado em 5-6 dias (SHOJAEI, 1998; WOODLEY, 2001a). À medida que as células se aproximam das camadas superficiais, elas aumentam de tamanho e se tornam mais achatadas (SHOJAEI, 1998). Um tecido conjuntivo liga as estruturas desse epitélio às estruturas subjacentes, compostas por vasos sanguíneos que drenam as regiões retromandibulares, lingual e facial (MORALES; MCCONVILLE, 2011).



**Figura 1.** Estrutura morfológica da mucosa bucal. Fonte: Autoria própria

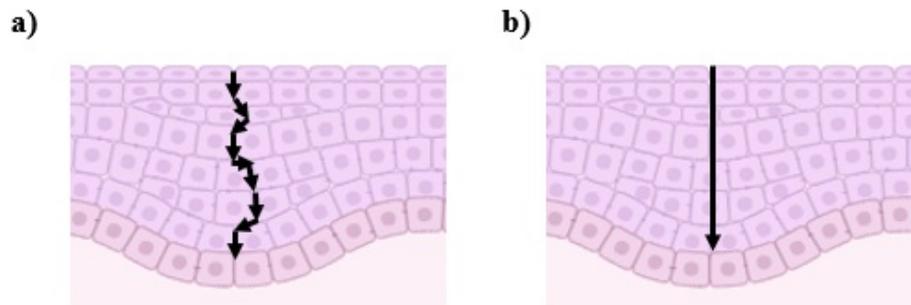
A mucosa bucal é revestida por um filme salivar, com cerca de 70-100 µm, que é distribuído sobre as superfícies da boca (células epiteliais e esmalte do dente) e é secretado pelas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018). A saliva é considerada um tampão fraco, com pH de 5-7, possuindo como seus principais componentes muco, proteínas, minerais e enzimas (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018).

O muco é uma secreção bastante viscosa e aderente sintetizada por células caliciformes especializadas (SMART, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). Ele é composto principalmente por lipídios, sais inorgânicos, água e glicoproteínas, chamadas mucinas (SMART, 2005). Estas glicoproteínas são macromoléculas (0,5 a 30 MDa) com carga negativa em pH fisiológico, permitindo que se fixe às células epiteliais formando uma camada de gel (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018). O muco lubrifica a passagem de objetos pelo tecido que ele cobre, mantém a hidratação do epitélio e funciona como barreira contra patógenos e outras substâncias nocivas (SMART, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

### **3.1.1 Mecanismos de permeação de fármacos através da mucosa**

Apesar da morfologia e estrutura lipídica do epitélio serem consideradas barreira para a penetração de fármacos na mucosa bucal (WANASATHOP et al., 2021), a diferença na composição lipídica, ausência de camada de queratina e a sua grande extensão de tecido liso facilita o processo de permeação e torna essa superfície ideal para sistemas de liberação retentivos, como filmes mucoadesivos (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; MORALES; MCCONVILLE, 2011; FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018). Além de ser uma via de fácil administração para o paciente, o grande fluxo sanguíneo na região favorece a biodisponibilidade sistêmica e evita o metabolismo hepático de primeira passagem e a degradação gastrointestinal do fármaco (BRUSCHI; DE FREITAS, 2005; FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018).

A natureza dos lipídeos no espaço intercelular permite duas rotas diferentes de transporte através do epitélio bucal, a via transcelular e a via paracelular (Figura 2). Isso porque os lipídeos dessa região possuem um domínio lipofílico e um domínio hidrofílico, sendo a natureza lipofílica das membranas celulares responsável pela passagem de moléculas com altos valores de log P através das células, enquanto a natureza hidrofílica dos espaços intercelulares favorece a penetração de moléculas menos apolares (SHOJAEI, 1998; MORALES; MCCONVILLE, 2011; HEARNDEN et al., 2012).



**Figura 2.** Esquema representativo das vias de permeação do fármaco na mucosa bucal. (a) via paracelular, (b) via transcelular. Fonte: Autoria própria.

Embora as duas rotas de permeação possam ser utilizadas concomitantemente, as características do fármaco definem qual será a via preponderante. Substâncias lipossolúveis, não ionizadas e com baixo peso molecular conseguem se difundir com mais facilidade nesses tecidos (SHOJAEI, 1998).

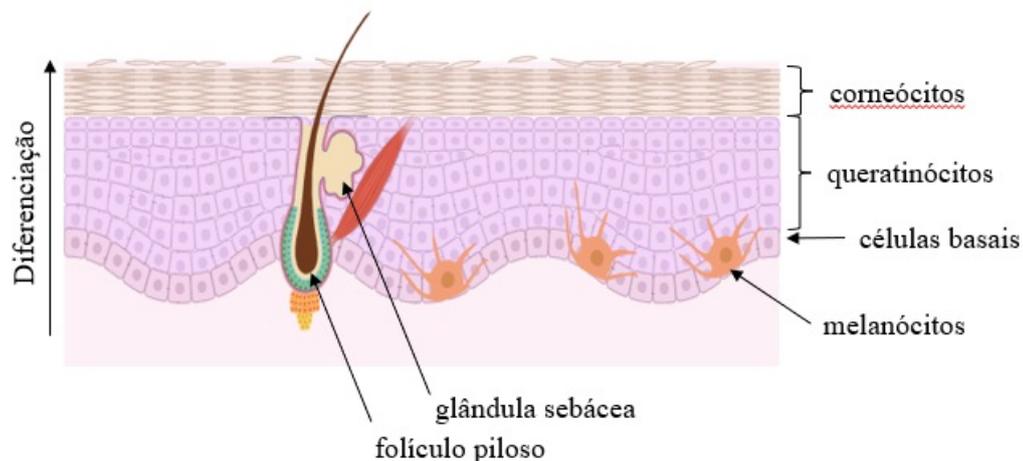
Apesar de possuir uma maior permeabilidade em relação a pele, essa característica da mucosa oral difere significativamente em determinadas regiões, devido à diferenciação epitelial, como é o caso do palato duro e assoalho da boca. Em que pese os tecidos queratinizados possuírem uma permeabilidade mais baixa em relação aos não queratinizados, essa diferença ocorre principalmente pela composição lipídica dos grânulos de revestimentos e não pela presença de queratina como fator principal (SQUIER; COX; WERTZ, 1991; HEARNDEN et al., 2012).

### 3.2 PELE

A pele corresponde ao maior órgão do corpo humano e funciona como barreira para proteção do corpo aos vários agentes externos, além de possuir função sensorial e imunológica, regular a temperatura corporal e evitar a perda de água (WICKETT; VISSCHER, 2006). Ela é constituída por diferentes tipos celulares e estruturas que se organizam em camadas - a epiderme, a derme e abaixo dela, a camada subcutânea ou hipoderme (WICKETT; VISSCHER, 2006; ZAIDI; LANIGAN, 2010).

A epiderme (Figura 3) é composta principalmente por queratinócitos, cuja principal função é produzir queratina, mas também por melanócitos, Células de Langherans e células de Merkel. A epiderme não é irrigada por vasos sanguíneos e a obtenção de nutrientes é feita por difusão através da junção dermoepidérmica (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2006). Está dividida em quatro estratos, denominados estrato basal, estrato escamoso, estrato espinhoso e estrato córneo.

A queratina produzida pelos queratinócitos forma a estrutura interna dessas células, que se diferenciam, tornando-se mais finas e achatadas, à medida que se aproximam do meio externo para formar o estrato córneo, a camada mais superficial da epiderme (WICKETT; VISSCHER, 2006). Nessa diferenciação, as células nucleadas dos estratos granuloso e espinhoso tornam-se anucleadas e mortas no estrato córneo. Nessa camada elas já estão grandes, poliédricas, planas e preenchidas com queratina, o que confere essa característica de proteção da pele. A camada superior desse estrato córneo é descamada e posteriormente substituída pelas células que estão emergindo da camada basal (BOUWSTRA; PONEC, 2006).



**Figura 3.** Estrutura da epiderme. Fonte: Autoria própria.

As células basais da epiderme estão posicionadas mais internamente e são células presentes como uma camada única sobre a membrana basal, que aderem entre si por meio de junções desmossômicas (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2006). Trata-se de queratinócitos na forma colunar, com grandes núcleos, sendo as únicas células da epiderme mitoticamente ativas. É essa camada basal quem produz a matriz celular que constitui grande parte da membrana basal que separa a derme da epiderme (BLANPAIN; FUCHS, 2006). Danos no DNA dessas células podem alterar a proliferação celular e afetar diretamente a taxa de divisão celular (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2006). Os melanócitos são células que estão presentes predominantemente na camada basal e são responsáveis pela produção de pigmentos da epiderme. São células dendríticas que transferem a melanina produzida aos queratinócitos por meio de seus dendritos.

A melanina é produzida em uma organela ligada à membrana, chamada melanossoma, um aumento da exposição à luz aumenta a melanogênese. Essa melanina forma uma película protetora sobre a parte externa nos queratinócitos e confere proteção, reduzindo a quantidade de radiação oriunda dos raios UV que penetram a pele (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2006). Os melanócitos estão na proporção de um para cada dez células basais, em

média.

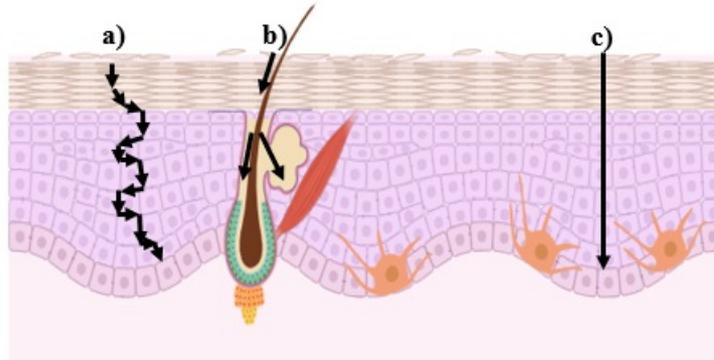
As células de Langerhans são células apresentadoras de antígenos, derivadas da medula óssea, e formam a primeira linha de defesa imunológica da pele. Elas possuem núcleo lobulado e grânulos na forma de raquete. As células de Merkel também são encontradas na camada de células basais próximas aos folículos pilosos (ZAIDI; LANIGAN, 2010).

Abaixo da epiderme situa-se a derme, onde são localizadas fibras de colágeno, fibras elásticas, fibroblastos, mastócitos, histiócitos, vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos. As fibras encontradas nessa região dão resistência e sustentação à pele e os vasos sanguíneos fornecem nutrientes e ajudam a manter a temperatura corporal. Os nervos nessa região podem ser mielinizados ou não e são responsáveis pelas sensações cutâneas. Já os apêndices epidérmicos compreendem os folículos pilosos, as glândulas sebáceas, as glândulas sudoríparas e as unhas (ZAIDI; LANIGAN, 2010).

Já o tecido subcutâneo, que fica abaixo da derme, é composto por células de gordura, os adipócitos, que atuam como isolante térmico, amortecem o corpo contra traumas e atuam como armazenamento nutricional. Além disso, essa camada apresenta tecido conjuntivo transpassado por nervos e vasos sanguíneos (ZAIDI; LANIGAN, 2010; NG; LAU, 2015).

### **3.2.1 Mecanismos de permeação de fármacos através da pele**

A pele é uma via importante de administração de medicamentos, principalmente em processos patológicos que afetam a pele, por permitir a liberação direta de fármacos no seu local de ação, evitar a biotransformação de primeira passagem, permitir a autoadministração e não ser uma via que requer procedimentos invasivos para administração de fármacos (VIGATO et al., 2019). Contudo, essa via encontra algumas dificuldades, sobretudo na absorção de fármacos, já que a estrutura extremamente organizada do estrato córneo possui uma composição lipídica (ceramidas de cadeia longa, ácidos graxos livres e colesterol) diferente de outras membranas biológicas (BOUWSTRA et al., 2003). Dessa forma, os fármacos possuem três vias para atravessar essa barreira: a via intercelular, na qual a substância se difunde contornando os corneócitos; a via transcelular, na qual o fármaco atravessa os corneócitos de maneira direta; ou por rotas alternativas como estruturas capilares, glândulas sebáceas ou sudoríparas (GRATIERI et al., 2008; ALEXANDER et al., 2012; HANSEN; LEHR; SCHAEFER, 2013; PHATALE et al., 2022) (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema representativo das vias de permeação do fármaco na pele. (a) via paracelular, (b) rotas alternativas e (c) via transcelular. Fonte: Autoria própria.

Além das três vias descritas acima, existem proteínas transportadoras que auxiliam na absorção de grandes moléculas, como a glicoproteína P (PHATALE et al., 2022).

No entanto, mesmo com essas possibilidades de rotas de permeação, a estrutura de barreira da pele dificulta a entrada de agentes terapêuticos. Portanto, a efetividade desta via de administração depende muito das características físico-químicas e propriedades farmacológicas do fármaco, como baixo peso molecular e lipofilicidade da molécula (VIGATO et al., 2019). Ainda pode ser necessário o uso de intensificadores de permeação, como promotores de permeação, que possuem a capacidade de dissolver os lipídios da pele ou perturbar a estrutura intercelular do estrato córneo. Além disso, a escolha da formulação é um fator importante para a dispersão do fármaco (PHATALE et al., 2022).

### 3.3 CÂNCER

O câncer refere-se a um crescimento desordenado de células anormais de qualquer órgão ou tecido do corpo. Essas células dividem-se rapidamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo, em um processo chamado metástase. De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde, em 2019, o câncer é a primeira ou segunda causa principal de morte antes dos 70 anos em 112 de 183 países e ocupa o terceiro ou quarto em mais 23 países, com 9,6 milhões de mortes, em 2018, em todo o mundo (SUNG et al., 2021; WHO, 2022).

Os tumores podem ser localizados e não invasivos (benignos) ou invasivos e metastáticos (malignos) e podem ser classificados de acordo com a origem (epitelial, mesenquimal, hematopoiética e neuroectodermal), sendo os mais comuns aqueles de origem epitelial, denominados carcinomas. Há ainda aqueles que não se enquadram nessa classificação,

pois não guardam relação com o sistema de origem, como é o caso do melanoma, uma vez que os melatócitos têm origem embrionária na crista neural, mas durante o desenvolvimento não guarda conexão direta com o sistema nervoso (WEINBERG, 2013).

O câncer surge do acúmulo de mutações genéticas que alteram a regulação normal do crescimento, diferenciação e apoptose celular. Essas mutações podem ocorrer devido a vários fatores, incluindo exposição a carcinógenos, predisposição genética e erros aleatórios durante a replicação do DNA. Os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer incluem: mutações genéticas que podem levar à ativação de proteínas que promovem o crescimento e a divisão celular ou a supressão de tumores (gene p53), alterações na regulação do ciclo celular (ciclina e quinases), alterações no processo de apoptose e angiogênese, desregulação das vias e sinalização (PI3K/AKT/mTOR), metilações do DNA e modificações de histonas, entre outras (BERTRAM, 2001).

### **3.3.1 Câncer de cabeça e pescoço**

Câncer de cabeça e pescoço é um termo amplo usado para englobar neoplasias epiteliais que surgem nas cavidades nasal e oral, seios paranasais da face, faringe, laringe e tireoide (DA SILVA et al., 2020; INCA, 2022c). Parte considerável dessas neoplasias (acima de 30%) ocorrem na cavidade bucal (assoalho bucal, língua, base da língua, palato duro e lábios) (DA SILVA et al., 2020). De acordo com estimativa da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), em 2020 ocorreriam 377.713 novos casos e 177.757 óbitos por câncer de boca no mundo (SUNG et al., 2021). A referida agência aponta uma diferença entre as taxas de incidência e mortalidade entre os países, já que melhores condições de renda e desenvolvimento reduzem a taxa de mortalidade, mesmo com taxas de incidência elevadas (SUNG et al., 2021; INCA, 2022c). O Brasil apresenta a maior taxa de incidência e a segunda maior taxa de mortalidade da América do Sul, com 3,6 casos e 1,5 mortes por 100 mil habitantes (INCA, 2022c). Apesar de ser mais frequente em homens, a diferença entre homens e mulheres vem diminuindo nos últimos anos. Outra alteração na frequência refere-se à idade, pois os casos aumentaram em pessoas com idade inferior a 45 anos, e esse novo comportamento pode estar relacionado à alta prevalência do papilomavírus humano (HPV), apontado como um fator de risco cada vez mais importante para esses tipos de cânceres (DA SILVA et al., 2020).

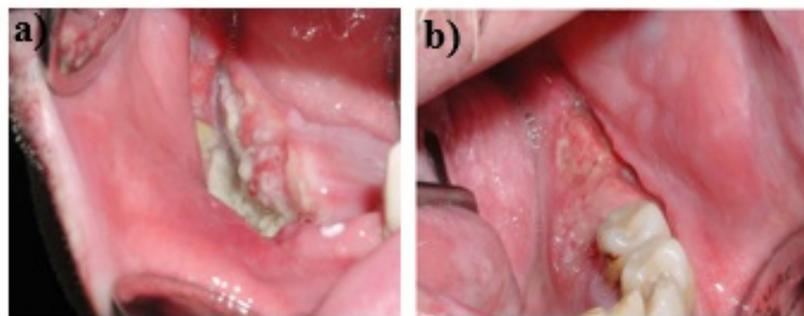
Embora a etiologia da doença seja multifatorial, o tabaco, o álcool e o HPV são os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessas neoplasias (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019; DA SILVA et al., 2020). Dentre esses, o tabaco é o principal fator etiológico ligado ao desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019; INCA, 2022c), com 5 vezes mais chances de um tabagista desenvolver câncer na cavidade oral, orofaringe e hipofaringe e 10 vezes mais chances de desenvolvimento na laringe, quando comparado a não tabagistas (ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019). Esse risco permanece, em particular na cavidade bucal, mesmo sem fumaça, como com o uso de rapé ou mascando-se fumo (NEVILLE; DAY, 2002; ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019; INCA, 2022c).

O consumo de álcool pode estar correlacionado de forma isolada com os casos de câncer de cabeça e pescoço. No entanto, o seu fator de risco funciona sinergicamente ao uso de tabaco (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019; INCA, 2022c), pois o aumento desse risco tem sido associado a polimorfismos genéticos específicos em enzimas que metabolizam esses dois elementos (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008).

Quanto ao HPV, principalmente os tipos 16 e 18 têm sido considerados importantes fatores de risco nos últimos anos, principalmente para neoplasias de orofaringe (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019; INCA, 2022c), o que tem aumentado o número de casos, principalmente em pacientes jovens, muitas vezes sem relação com o uso tabaco ou álcool (DA SILVA et al., 2020; INCA, 2022c). Outros fatores também têm sido associados ao aumento do risco de desenvolvimento dessas neoplasias, como trabalhos industriais que envolvam exposição a pós de madeira, névoas ácidas, amianto, solventes, exposição prolongada à luz solar, doenças imunológicas e lesões pré-malignas (ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019).

Como mencionado anteriormente, o câncer na cavidade oral corresponde a cerca de 30% dos carcinomas de cabeça e pescoço (GENDEN et al., 2010), sendo mais de 90% do tipo carcinoma celular escamoso (carcinoma espinocelular ou epidermoide), que se desenvolve no epitélio aerodigestivo superior (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; BHARADWAJ et al., 2019; ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019). Os demais representam configurações mais raras, como formas incomuns de carcinoma de células escamosas, tumores de glândulas salivares menores, melanomas, linfomas e sarcomas

(GENDEN et al., 2010). O carcinoma espinocelular pode surgir em qualquer parte da boca e origina-se no epitélio de revestimento da cavidade oral, os sinais e sintomas dependem da localização do carcinoma (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; INCA, 2022c). Na língua, ocorre como uma úlcera infiltrada e endurecida, diminuindo a sua motilidade. Na mucosa bucal e assoalho da boca, ocorre como úlceras com margens endurecidas (Figura 5). No palato duro, apresenta um crescimento exofítico papilar, que se destaca na superfície do tecido. No palato mole e úvula, ocorrem como úlcera com margens elevadas ou como massa fúngica (ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019). Manchas ou placas esbranquiçadas ou avermelhadas podem caracterizar o estágio inicial da doença, normalmente assintomático, acompanhada de perda parcial da elasticidade da mucosa. Em estágio posterior, com o aumento do tamanho da úlcera, pode tornar-se sintomática (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; GIRISA et al., 2021; INCA, 2022c).



**Figura 5.** (a) Carcinoma de células escamosas no rebordo alveolar, (b) carcinoma de células escamosas na gengiva. Fonte: Adaptado de Bagan et al (2010) (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010).

Alterações citogenéticas e processos epigenéticos podem modificar a progressão do ciclo celular, os mecanismos de reparo do DNA, a diferenciação e a apoptose, resultando em queratinócitos instáveis, dando início à carcinogênese. Essas alterações podem causar mutações aleatórias ou erros no processo de reparo do DNA, que podem ser repassadas aos seus clones (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; RIVERA, 2015).

### 3.3.2 Câncer de pele

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de pele não melanoma é o tumor maligno mais incidente no Brasil, com 31,3% do total de casos, seguido pelos de mama feminina, com 10,5%, próstata, com 10,2%, cólon e reto, com 6,5%, pulmão, com 4,6% e estômago, com 3,1% (INCA, 2022a). Ainda de acordo com a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) o câncer de pele não melanoma é responsável por mais de um milhão de novos casos (excluindo o

carcinoma basocelular) em todo o mundo (SUNG et al., 2021). Apesar da alta incidência, se for tratado precocemente, possui altos percentuais de cura. Dentre os não melanoma, os mais comuns são carcinoma basocelular, de origem nas células basais, e carcinoma espinocelular, de origem nas células escamosas da pele (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; LEITER; KEIM; GARBE, 2019). Já o melanoma, que tem origem nos melanócitos, representa apenas 3% das neoplasias malignas desse órgão. No entanto, é o mais grave nesse tecido pela alta probabilidade de provocar metástase (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; LEITER; KEIM; GARBE, 2019; INCA, 2022b).

O câncer de pele está associado a uma combinação de fatores genéticos e ambientais, sendo de 90-95% atribuídos a exposição aos raios UV (MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010; LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015; LEITER; KEIM; GARBE, 2019). Outros fatores de risco incluem exposição ao arsênio, imunossupressão e infecções virais (como papilomavírus humano) (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015; SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; LEITER; KEIM; GARBE, 2019).

### 3.3.2.1 Carcinomas não melanoma

#### a) *Carcinoma espinocelular*

O carcinoma espinocelular é o segundo mais comum entre os não melanomas (KALLINI; HAMED; KHACHEMOUNE, 2015). Ele surge a partir de queratinócitos escamosos na epiderme da pele ou mucosas (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017), podendo surgir também a partir de lesões pré-malignas, como a ceratose actínica ou queilite actínica (RUDOLPH; ZELAC, 2004; KALLINI; HAMED; KHACHEMOUNE, 2015). Esse carcinoma geralmente se desenvolve em áreas expostas ao sol, em que cerca de 55% ocorrem na cabeça e pescoço, podendo ocorrer em outros locais, como ombros, costas e pernas. As manifestações clínicas podem iniciar a partir de lesões em superfícies expostas ao sol que não cicatrizam, evoluindo para pápulas ou manchas eritematosas com aspecto escamoso, podendo progredir para nódulos, contendo ou não sangramento (Figura 6a) (KALLINI; HAMED; KHACHEMOUNE, 2015; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017). Esse carcinoma pode apresentar metástase na ocorrência de 3 a 10%, a depender do tamanho, condições médicas subjacentes e localização do tumor (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017). Normalmente a metástase ocorre para os pulmões, fígado, ossos e cérebro (KALLINI; HAMED; KHACHEMOUNE, 2015). Esses carcinomas, quando induzidos pelo HPV, podem se manifestar por aparecimento de verrugas no pênis, vulva ou regiões próximas (KALLINI;

HAMED; KHACHEMOUNE, 2015).

*b) Carcinoma basocelular*

O carcinoma basocelular é a neoplasia maligna mais frequente no ser humano e aproximadamente 80% dos cânceres de pele. Ela surge a partir das células basais da epiderme e atinge principalmente pessoas de pele clara, fototipo I e II com histórico de exposições intermitentes de radiação UV (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; LEITER; KEIM; GARBE, 2019). Ocorre principalmente nas regiões expostas ao sol como nariz, orelhas, face e dorso das mãos, mas podendo ocorrer em qualquer parte do corpo, como axilas, mamas, área perianal, genitália, palmas das mãos e plantas dos pés (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015).

A radiação UV causa danos ao DNA, resultando em alterações em genes de supressão tumoral, como é o caso do p53. Além disso, essas alterações podem afetar o sistema de regulação e apoptose celular (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005).

A forma nodular desse carcinoma é a sua forma mais clássica e na maioria das vezes apresenta-se como uma pápula perolada ou nódulo, podendo apresentar crosta central ou ulceração. A forma superficial apresenta-se como uma placa, que pode ser eritematosa escamosa e conter melanina (Figura 6b). Já a forma morfoforme, ou esclerosante, apresenta-se como uma placa endurecida, esbranquiçada, com bordas e de aparência próxima a de uma cicatriz (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017).

Apesar do baixo potencial de metástase, quando ocorrem, elas normalmente partem de tumores primários na face e orelhas e seguem para linfonodos regionais, podendo chegar a ossos, pulmão e fígado. Os fatores de risco associados à metástase são localização (parte central da face ou orelhas), excisão incompleta, crescimento agressivo, longa duração e diâmetro do tumor (acima de 2 cm) (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017).



**Figura 6.** (a) Carcinoma basocelular, (b) carcinoma espinocelular, (c) melanoma. Fonte: Adaptado de Craythorne

et al (2017) (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017).

### 3.3.2.2 Melanoma

Apesar da baixa incidência, o melanoma é responsável por 65% de todas as mortes relacionadas ao câncer de pele, normalmente associados a pele branca e regiões mais expostas ao sol (GORDON, 2013; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; SCHADENDORF et al., 2018). Estão entre os fatores de risco lesões clinicamente atípicas, mutações genéticas hereditárias e melanoma prévio. Surge a partir dos melanócitos epidérmicos ou não (GORDON, 2013; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017). Ele pode ser induzido a partir de danos ao DNA dos melanócitos, em que a mutação no gene p16 associada à exposição à radiação UV pode resultar na proliferação descontrolada de melanócitos alterados (GORDON, 2013). Clinicamente, surgem na superfície da pele com uma pigmentação diferente, apresentando assimetria, irregularidade nas bordas, heterogeneidade na pigmentação (graus de bege, marrom ou preto), com elevação ou aumento da lesão (Figura 6c) (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017).

O melanoma superficial é o subtipo mais comum (75%), iniciando com um crescimento radial para posterior aprofundamento em camadas mais profundas. As bordas irregulares e a assimetria na borda da lesão podem indicar o avanço da proliferação dos melanócitos. O subtipo nodular, que compreende a forma mais agressiva da doença, apresenta rápido crescimento vertical, aprofundando-se nos tecidos, e baixo crescimento radial, o que dificulta a visualização inicial (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015).

### 3.3.3 Tratamentos

#### 3.3.3.1 Câncer de boca

O tratamento do carcinoma celular escamoso envolve a participação de vários profissionais, como cirurgiões, oncologistas, radiologistas, cirurgiões plásticos, fonoaudiólogos, nutricionistas e dentistas (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019). A decisão do tratamento passa pela avaliação de diversos fatores, como localização, estágio, condições do paciente, bem como o desejo de preservação de alguns tecidos e funcionalidades (ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008; GENDEN et al., 2010). A cirurgia e a radioterapia são os principais tratamentos, especialmente para lesões no estágio inicial (ARGIRIS, A.,

KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, 2008). No entanto, essas terapias possuem limitações, como perda de funcionalidade do tecido após a sua retirada em tratamentos cirúrgicos, ou sequelas a longo prazo, como xerostomia (boca seca), disfagia (dificuldade de deglutição) e osteorradionecrose (necrose asséptica de tecido ósseo), em tratamentos radioterápicos (GENDEN et al., 2010).

Já no estágio avançado da doença, o melhor tratamento é a terapia combinada, seja com combinação de cirurgia e radioterapia, ou inclusão de agentes adjuvantes, como quimioterápicos de ação sistêmica ou local (GENDEN et al., 2010; ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019). A combinação de radioterapia e quimioterapia pode diminuir a metástase e melhorar as condições do paciente, principalmente em pacientes em estágio avançado (ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019). No entanto, o uso de quimioterápicos também passa por limitações, com reações adversas importantes em relação ao seu uso, que vão desde diarreia, náuseas, vômitos, feridas na boca, neutropenia e trombocitopenia, até neurotoxicidade e cardiotoxicidade (ELKASHTY; ASHRY; TRAN, 2019; LIU et al., 2019).

### 3.3.3.2 Câncer de pele

O tratamento dos cânceres que acometem a pele depende inicialmente de um diagnóstico preciso (incluindo grau de progressão, margens e dimensões da lesão), acompanhado de demais fatores como natureza clínica e comorbidades do paciente. Possui como objetivo a erradicação completa da doença e a preservação da funcionalidade do tecido (MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010; SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

A base para o tratamento de carcinomas não melanomas em locais esteticamente não comprometedores é a remoção completa ou destruição da lesão (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017). O tratamento cirúrgico no carcinoma desses carcinomas inclui técnicas como curetagem e eletrodissecação, criocirurgia, excisão cirúrgica e cirurgia micrográfica de Mohs (técnica que inclui avaliação histológica, o que permite uma menor margem de excisão) (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005).

Em relação aos tratamentos não cirúrgicos tem-se a radioterapia, que é um recurso terapêutico que atinge altas taxas de cura para o carcinoma basocelular e o espinocelular. Normalmente é utilizada no tratamento de tumores em locais de difícil intervenção, na impossibilidade da prática cirúrgica, ou como adjuvante (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017). No entanto, essa técnica apresenta efeitos adversos como com atrofia tecidual, necrose e telangiectasia (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017).

Entre os tratamentos farmacológicos encontra-se aquele com o 5-fluoracil, que é um antineoplásico que interrompe a síntese de DNA e RNA inibindo a enzima timidilato sintetase, impedindo assim que a purina e a pirimidina sejam incorporadas ao DNA durante a fase S do ciclo celular. A aplicação tópica desse fármaco tem sido utilizada para o tratamento do carcinomas basocelular superficiais, sendo limitado à sua profundidade de penetração (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017), além da irritação local, eritema, edema, descamação e sensibilidade (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010; SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

Outra terapia utilizada no tratamento desses carcinomas é a terapia fotodinâmica. Nessa técnica, a luz, a um comprimento de onda específico, na presença de oxigênio, ativa um fotossensibilizador que é administrado ao paciente. Essa combinação resulta na produção de espécies reativas de oxigênio no local e consequente morte celular por necrose ou apoptose (RUBIN; CHEN; RATNER, 2005; MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010; SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017) de uma maneira mais específica, já que a luz é direcionada ao local do tumor, o que reduz efeitos adversos.

Nos melanomas, o tratamento primário consiste na excisão local com margens de segurança - normalmente margens de 5 mm para tumores *in situ*, margens de 10 mm para tumores com espessura de até 2 mm e 20 mm para tumores com espessura acima de 2 mm (categoria 2A para tumores > 4 mm de espessura) (SCHADENDORF et al., 2018). Ademais, as margens de excisão podem ser modificadas de acordo com as necessidades individuais. No entanto, mesmo após a cirurgia definitiva, há um risco substancial de recorrência do melanoma, principalmente para pacientes com melanoma no estágio 2B, 2C, 3 e 4 ressecável. Nesse caso, devem ser adotados tratamentos adjuvantes de forma a prevenir recidiva e metástase (SCHADENDORF et al., 2018), como radioterapia, ou agentes quimioterápicos sistêmicos, como metotrexato, cisplatina e doxorrubicina (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015; CHOUDHARI et al., 2020).

De um modo geral, os tratamentos adjuvantes dos carcinomas e melanomas envolvem altos níveis de toxicidade, resistência medicamentosa e recidivas (CHOUDHARI et al., 2020; SAJADIMAJD et al., 2020). Dessa forma, observa-se a importância do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que sejam mais seguras, eficazes e com um menor custo. Nesse sentido, produtos naturais e seus derivados têm recebido bastante atenção, sendo a origem de muitos medicamentos anticâncer inseridos no mercado nas últimas décadas (SAJADIMAJD et al., 2020), pois melhoram a eficiência do tratamento e diminuem as reações adversas. Entre os fitoquímicos que ganharam destaque estão os polifenóis, como a curcumina, principalmente por

possuir ação no controle da metástase de células malignas (JONES; KATIYAR, 2013; SAJADIMAJD et al., 2020).

### 3.4 CURCUMINA

#### 3.4.1 Utilização terapêutica da curcumina

A curcumina vem sendo utilizada em estudos para tratamento de vários tipos de câncer, como cânceres de mama, melanomas, cânceres de cabeça e pescoço, de próstata e de ovário (ALINEZHAD et al., 2017). As evidências sugerem que essa substância possui vários alvos moleculares como fatores de crescimento e seus receptores, fatores de transcrição, citocinas, enzimas e genes que regulam apoptose e a proliferação celular (KUNNUMAKKARA; ANAND; AGGARWAL, 2008; KEYVANI-GHAMSARI; KHORSANDI; GUL, 2020). Ela também atua reduzindo a expressão de proteínas relacionadas à resistência e aumentando o desempenho a outros fármacos antitumorais (KEYVANI-GHAMSARI; KHORSANDI; GUL, 2020).

Esse fármaco atua na expressão do fator nuclear NF $\kappa$ B que controla a proliferação celular, metástase, angiogênese, apoptose e resistência a quimioterapia. A regulação negativa desse fator é mediada pela supressão da ativação da quinase I $\kappa$ B. A curcumina também suprime as cascatas de sinalização de proliferação, como PI3K, AKT, mTOR, AP1 (JUN e FOS), JNK, JAK-STAT, PKC, CMYC, MAPK, ELK, CDKs, iNOS e Wnt /  $\beta$  catenina, impedindo a promoção do câncer por direcionar a sinalização de proliferação celular múltipla. Também suprime a expressão de COX2, LOX, NOS, MMP-9, uPA, TNF, quimiocinas, moléculas de adesão da superfície celular e ciclina D1 (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003). Em relação ao câncer de pele, estudo *in vivo* verificou o efeito antimetastático da curcumina, que inibiu a metástase pulmonar de células de melanoma B16F10 após administração oral da substância (200 nmol/Kg de peso corporal), reduzindo o número de nódulos pulmonares (80%) e aumentando a expectativa de vida dos ratos em mais de 140%. Essa inibição de metástases pulmonares ocorreu por meio da inibição das metaloproteinasas, que inibiu a invasão de células de melanoma (KUNNUMAKKARA; ANAND; AGGARWAL, 2008). No entanto, apesar das inúmeras evidências da ação da curcumina, ela apresenta limitações físico-químicas que resultam em baixa biodisponibilidade (PRIYADARSINI, 2014), má absorção e rápida eliminação sistêmica, o que reduziria a sua vantagem terapêutica. Por esses motivos, vários estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento de formulações que retardem essa degradação ou promovam rotas alternativas de liberação dessa substância ao seu local de ação

(NIU et al., 2016; DE MATOS et al., 2018; FADEEL; KAMEL; FADEL, 2020; MARINHO et al., 2022).

### 3.4.2 Aspectos físico-químicos

A curcumina é uma das principais substâncias encontradas no rizoma da *Curcuma longa* (Figura 7), da família Zingiberaceae (LESTARI; INDRAYANTO, 2014). No Brasil, suas denominações populares são "cúrcuma", "açafão", "gingibre dourado" e "açafão da terra". Durante séculos, a cúrcuma foi usada como especiaria, corante para alimentos e agente terapêutico na medicina tradicional chinesa (MUQBIL et al., 2011; ESATBEYOGLU et al., 2012). Já em 1280 Marco Polo mencionava o açafão em seus registros de viagens à China e à Índia. Nesse mesmo século, comerciantes árabes levaram o açafão-da-índia para o mercado europeu, sendo combinado posteriormente com várias outras especiarias para formar curry, tempero em pó feito a partir dessa mistura (ESATBEYOGLU et al., 2012). A *Curcuma longa* é uma rizomatosa, originalmente cultivada no sudeste da Ásia tropical (MUQBIL et al., 2011), e atualmente é cultivada em várias outras partes do mundo, incluindo Sudeste Asiático, China e América Latina (ESATBEYOGLU et al., 2012; KOTHA; LUTHRIA, 2019).

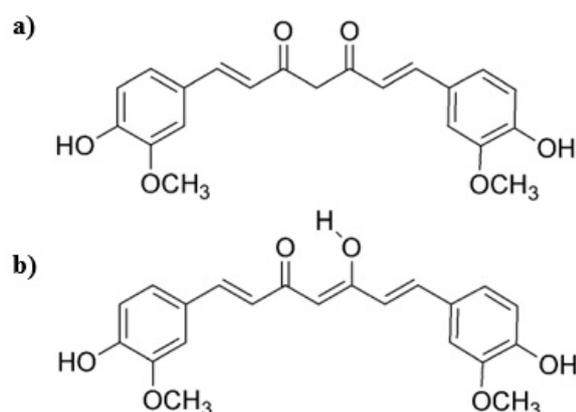


**Figura 7.** Rizoma da *Curcuma longa*. Fonte: Autoria própria.

A curcumina pertencente ao grupo dos curcuminoides, que são fenóis naturais responsáveis pela coloração amarela do açafão (BASNET; SKALKO-BASNET, 2011; ALINEZHAD et al., 2017). Comercialmente, a curcumina apresenta dois outros curcuminoides, a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina (BASNET; SKALKO-BASNET, 2011; ESATBEYOGLU et al., 2012).

A estrutura da curcumina [(1E, 6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona] (Figura 8) exibe tautomerismo ceto-enol, que é um caso especial de isomerismo estrutural no qual a mudança na posição de uma dupla ligação e de um átomo de hidrogênio

resulta em um par de isômeros constitucionais (BASNET; SKALKO-BASNET, 2011; LESTARI; INDRAYANTO, 2014). O equilíbrio dessa tautomeria é parcialmente dependente do pH e da polaridade do solvente. A forma enol é predominante em solventes não polares, enquanto a forma ceto, nos solventes polares (ESATBEYOGLU et al., 2012; ALINEZHAD et al., 2017).



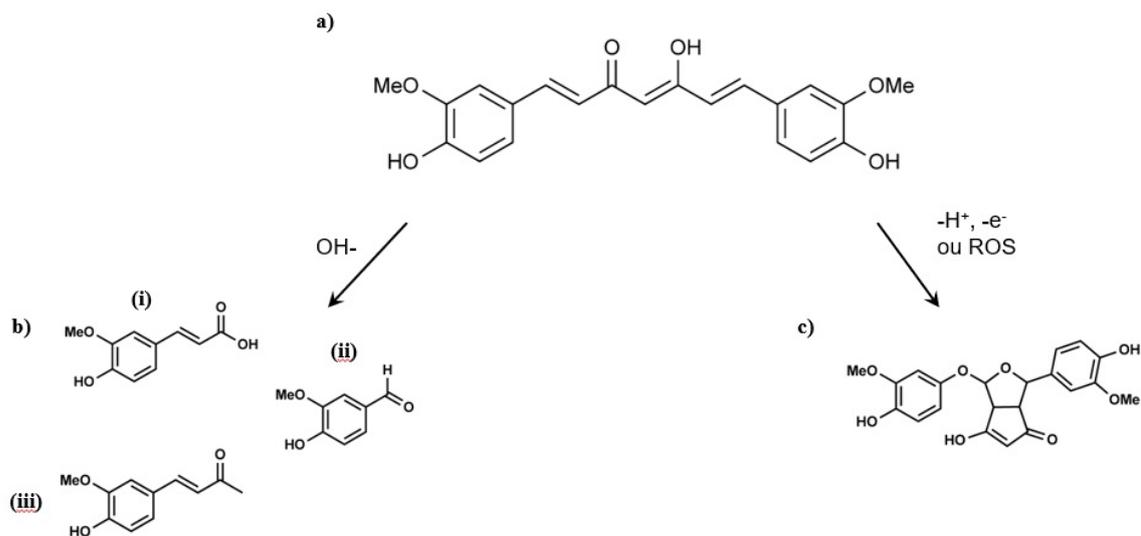
**Figura 8.** Fórmula estrutural da curcumina. a) forma ceto, b) forma enol.

A curcumina é praticamente insolúvel em água à temperatura ambiente; contudo, devido à sua natureza lipofílica,  $\log P = 3,29$  (LESTARI; INDRAYANTO, 2014; JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020), é solúvel em etanol, acetona, dimetilsulfóxido e outros solventes orgânicos (BASNET; SKALKO-BASNET, 2011; ESATBEYOGLU et al., 2012; LESTARI; INDRAYANTO, 2014; KOTHA; LUTHRIA, 2019; JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020). Tem ponto de fusão de 183 °C, CAS: 458-37-7, fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_6$  e peso molecular de 368,37 g/mol (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003; BASNET; SKALKO-BASNET, 2011; ESATBEYOGLU et al., 2012; LESTARI; INDRAYANTO, 2014). Em relação ao pKa, há relatos de três valores diferentes, sendo dois para os grupos fenólicos OH ( $pK_{a1} = 7,75 - 07,80$  e  $pK_{a2} = 8,55$ ) e o terceiro para o próton enólico ( $pK_{a3} = 9,05$ ) (TENNESEN; KARLSEN; HENEGOUWEN, 1986; LESTARI; INDRAYANTO, 2014; PRIYADARSINI, 2014).

A curcumina possui três principais sítios reativos, sendo um deles quelante de metal. Essa porção quelante forma complexos com vários íons metálicos, como cobre, cromo, arsênico, mercúrio, chumbo e cádmio, reduzindo a toxicidade induzida por esses metais, o que proporciona uma ação promissora da curcumina contra doenças como Alzheimer, câncer, depressão e artrite (KOTHA; LUTHRIA, 2019).

A curcumina exibe propriedades de um indicador ácido-base, em um estado ionizado ( $pH < 1$  e  $pH > 7$ ) exibe uma cor vermelha, enquanto no estado neutro ( $pH 1-7$ ) exibe cor amarelo brilhante (BASNET; SKALKO-BASNET, 2011; ESATBEYOGLU et al., 2012;

LESTARI; INDRAYANTO, 2014). Esse fármaco também possui uma sensível estabilidade química, sendo rapidamente degradado em pH fisiológico por meio de hidrólise alcalina ou auto-oxidação (Figura 9). Os produtos de hidrólise alcalina (reação de hidrólise mediada por  $\text{OH}^-$ ) são principalmente vanilina, ácido ferúlico e feruloilmetano (HJORTH TENNESEN; KARLSEN; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, 1986; WANG et al., 1997; LESTARI; INDRAYANTO, 2014). Já a auto-oxidação ocorre por meio da formação de radicais fenólicos, como acontece na formação da biciclopentadiona (ZHU et al., 2017).



**Figura 9.** a) curcumina; b) produtos de degradação resultante da hidrólise (i) ácido ferúlico, (ii) vanilina, (iii) feruloilmetano; c) produto de degradação resultante da auto-oxidação: biciclopentadiona.

A estrutura da curcumina também pode absorver radiação por meio de suas regiões cromóforas. Sendo chamada de singlete, no seu estado fundamental ( $^1\text{CUR}$ ), pode chegar ao estado de singlete excitado ( $^1\text{CUR}^*$ ) quando absorve fótons de radiação, ou ainda atingir um estado excitatório de energia mais alta por cruzamento intersistema, conhecido como estado de tripleto excitado ( $^3\text{CUR}^*$ ). Em ambos os casos, pode voltar ao seu estado fundamental ( $^1\text{CUR}$ ) por um processo de transição radioativa, que resulta na emissão de luz (fluorescência). E esse estado mais excitado ( $^3\text{CUR}^*$ ) é o principal responsável por iniciar a cascata de reações fotoquímicas para a formação de espécies reativas de oxigênio, por meio das reações do tipo I e II, utilizadas nas terapias fotodinâmicas (PRIYADARSINI, 2009; MARINHO et al., 2022).

### 3.4.3 Aspectos farmacocinéticos

Quanto aos parâmetros farmacocinéticos, a curcumina apresenta baixa absorção intestinal e rápido metabolismo no fígado, sendo a sua maior parte excretada de forma inalterada pelas fezes e pequena parte excretada pela urina (ESATBEYOGLU et al., 2012). Essa característica está relacionada principalmente à sua baixa solubilidade em água (0,0004 mg/mL)

e sensibilidade ao pH fisiológico (pH 7,3) (SHEN; JI, 2012; ALINEZHAD et al., 2017). Portanto, a deficiente propriedade farmacocinética explica a baixa eficácia da curcumina em algumas aplicações e consequente limitação para seu uso terapêutico (SHEN; JI, 2012; NELSON et al., 2017; KOTHA; LUTHRIA, 2019).

#### **3.4.4 Segurança**

Pequenas doses de açafrão são ingeridas diariamente em muitos países como tempero. Somado a isso, o FDA reconheceu a curcumina como uma substância segura (BASNET; SKALKO-BASNET, 2011). Estudos conduzidos em ratos, cães ou macacos por um período de até 90 dias, com doses orais de 3500 mg/Kg de massa corpórea, não mostrou nenhuma reação adversa associada à curcumina (BASNET; SKALKO-BASNET, 2011). Além disso, estudo de toxicidade reprodutiva observando duas gerações sucessivas de ratos, demonstrou ausência de toxicidade com a administração oral de até 1000 mg de curcumina por kg de massa corpórea (GANIGER et al., 2007).

A segurança do fármaco também foi avaliada por meio de estudo clínico de fase I em pacientes com câncer colorretal avançado. Nesse estudo, a curcumina foi bem tolerada em doses acima de 3600 mg/dia por até quatro meses (SHARMA et al., 2004). Portanto, a curcumina é considerada segura e bem tolerada em humanos mesmo em doses elevadas (LAO et al., 2006; BASNET; SKALKO-BASNET, 2011).

### **3.5 FILMES COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO**

Apesar das inúmeras evidências em relação à ação terapêutica da curcumina, a baixa solubilidade desse fármaco em água e a sua sensibilidade em pH fisiológico são fatores limitantes da sua utilização (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012). Essa condição justifica a busca por novas formas farmacêuticas e sistemas de liberação para melhorias de suas propriedades farmacocinéticas (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2012).

Tendo em vista a aplicação tópica da curcumina, uma das alternativas promissoras, que é proposta neste trabalho para resolver esses desafios, é a obtenção de filmes bioadesivos. Esses filmes são sistemas de liberação de fármacos compostos por substâncias que apresentam propriedades bioadesivas após hidratação. Essa bioadesão ocorre por meio da ligação de um polímero, natural ou sintético, a um substrato biológico, ocorrendo a fixação de duas superfícies entre si. Quando essa adesão ocorre em mucosas ela também pode ser chamada de mucoadesão (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). As principais mucosas utilizadas para administração

de agentes terapêuticos são nasal, pulmonar, retal, vaginal, bucal e sublingual (MANOHAR; SRIDHAR; MALLIKARJUNA, 2012).

Os filmes bioadesivos são desenvolvidos para carrear o fármaco e disponibilizá-lo diretamente em seu local de ação, mantendo assim a formulação na superfície biológica onde ocorrerá a sua ação, aumentando a sua biodisponibilidade (PATEL; PRAJAPATI; PATEL, 2007; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). Além disso, possui outras vantagens como: evitar o metabolismo pré-sistêmico no trato gastrointestinal, diminuir o efeito de primeira passagem do fármaco, controlar a liberação do fármaco por período prolongado, iniciar a ação de forma rápida, facilitar a aplicação e remoção, mesmo em pacientes inconscientes ou com traumas, facilitar a aplicação de intensificadores de permeação, e dar flexibilidade no estado físico, como forma e tamanho (MORALES; MCCONVILLE, 2011; MANOHAR; SRIDHAR; MALLIKARJUNA, 2012; LESTARI; INDRAYANTO, 2014; GUPTA, 2020; SHARMA et al., 2024).

A adesão desses filmes pode ocorrer por meio de ligações iônicas, ligações covalentes, ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals. Há várias teorias para justificar a mucoadesão; entretanto, nesse processo várias teorias podem estar envolvidas a depender da forma farmacêutica, grau de hidratação ou presença e integridade do muco (SMART, 2005; KHUTORYANSKIY, 2011; GUPTA, 2020). As principais teorias que explicam a mucoadesão são:

I. Teoria eletrônica: é aplicável quando o polímero e o muco possuem diferentes características eletrônicas. Sugere a transferência de elétrons quando ocorre o contato entre as superfícies devido às diferenças da estrutura eletrônica, gerando atração eletrostática;

II. Teoria da umectação: é aplicável quando o polímero tem a capacidade de se espalhar pelo muco, o que ocorre principalmente quando líquidos estão envolvidos nos sistemas, em que um líquido se espalha espontaneamente para o desenvolvimento da adesão, formando um ângulo de contato. Nesse caso, quanto menor o ângulo de contato, maior a afinidade do líquido com o sólido;

III. Teoria da adsorção: é aplicável quando se considera que a atração ocorre por meio de interações específicas como ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, sendo uma das principais na interação adesiva;

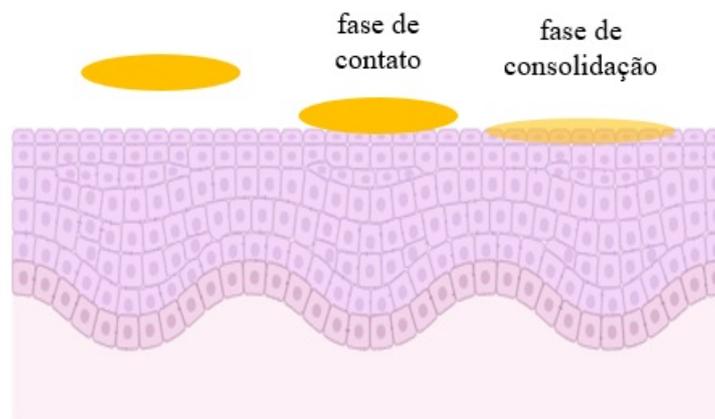
IV. Teoria da difusão: é aplicável quando há uma penetração das macromoléculas mucoadesivas no muco concomitantemente com a difusão de mucinas solúveis na forma

farmacêutica. Esse processo é influenciado pelo gradiente de concentração, peso molecular das macromoléculas mucoadesivas, tamanho hidrodinâmico e mobilidade;

V. Teoria mecânica: considera-se o efeito da rugosidade da superfície, favorecendo a adesão devido a uma maior área de contato;

VI. Teoria da fratura: está relacionada com a força necessária para o desprendimento das duas superfícies (SMART, 2005; KHUTORYANSKIY, 2011).

Como a mucoadesão é resultado de vários mecanismos, normalmente é dividida em duas etapas: a primeira é uma fase de contato, na qual há a proximidade íntima entre o filme e o tecido, e a segunda é um estágio de consolidação, no qual as interações físico-químicas ocorrem para fortalecer a adesão de uma forma prolongada (Figura 10) (SMART, 2005; KHUTORYANSKIY, 2011; GUPTA, 2020; SHARMA et al., 2024). Essa etapa de consolidação pode ocorrer de duas formas, pela interpenetração macromolecular, em que as moléculas mucoadesivas se interpenetram e se ligam às glicoproteínas do muco, ou pela desidratação, em que um material capaz de gelificar rapidamente na presença de água é colocado em contato com um local que fornece esse ambiente (muco), causando uma pressão osmótica e uma força de inchaço, sendo importante encontrar a hidratação necessária para evitar uma super-hidratação e formação de mucilagem escorregadia facilmente removível. Essa forma de desidratação é importante principalmente em regiões mais expostas a tensão como a boca. Já em regiões secas, como a pele, esses filmes só precisam ser ativados pela presença de umidade para que se adaptem ao formato da superfície (SMART, 2005; GUPTA, 2020).



**Figura 10.** Fases da bioadesão. Fonte: Autoria própria.

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica na configuração de filme bioadesivo passa por desafios como melhora da mucoadesividade, aumento da permeação e controle da

liberação do fármaco. Para isso, a escolha do polímero utilizado na formulação é fundamental para o seu desempenho.

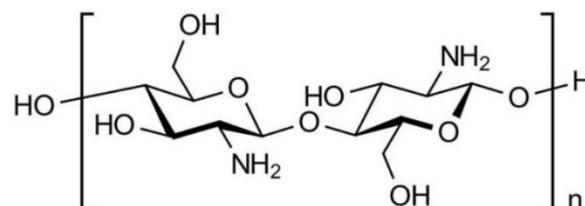
Os polímeros hidrofílicos, por exemplo, demonstram uma boa capacidade de adesão às mucosas, por permitir interações em cadeia com a mucina, moléculas na mucosa bucal (MORALES; MCCONVILLE, 2011). Outras características importantes desses polímeros são a presença de carga (aniônica ou catiônica), grupos funcionais (como carboxila, hidroxila, amino e sulfato), alto peso molecular, flexibilidade da cadeia e propriedades de energia de superfície que favoreçam o espalhamento do muco (KHUTORYANSKIY, 2011).

As misturas poliméricas (blendas poliméricas) também podem ser utilizadas como forma simples de combinar características dos diferentes polímeros, levando à formação de materiais com propriedades que não são observadas em polímeros isolados, como aumento da miscibilidade, mucoadesividade, resistência e transparência (KANATT et al., 2012; VECCHI et al., 2021).

### 3.5.1 Polímeros utilizados no preparo de filmes

#### 3.5.1.1 Quitosana

A quitosana é um polímero natural extensivamente estudado na preparação de filmes bioadesivos (AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020). Trata-se de um polissacarídeo catiônico (Figura 11) formado a partir da N-desacetilação parcial da quitina, substância encontrada no exoesqueleto de crustáceos, fungos e insetos (LUO et al., 2008). É um polímero biocompatível e biodegradável, com características promissoras no que se refere à matriz para liberação sustentada de fármacos, propriedades para formação de filmes, propriedades mucoadesivas, além de aumentar a penetração na pele (PATEL; PRAJAPATI; PATEL, 2007; LUO et al., 2008; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020).



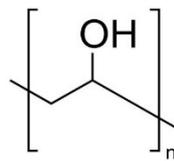
**Figura 11.** Fórmula estrutural da quitosana.

Apesar das inúmeras vantagens em relação à utilização da quitosana, geralmente se faz necessária a inclusão de outros polímeros a fim de contornar a baixa estabilidade mecânica dos

filmes produzidos apenas com quitosana (LUO et al., 2008; AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020). Nesse sentido, os grupamentos hidroxila e amina da quitosana permitem a constituição de ligações de hidrogênio na formação de blendas poliméricas (KANATT et al., 2012), que permitem um melhor delineamento das propriedades do filme resultante.

### 3.5.1.2 Álcool polivinílico

O PVA é um polímero sintético atóxico, biocompatível, biodegradável (KANATT et al., 2012; LIU; ZHANG; GUO, 2022) e hidrofílico, obtido a partir da polimerização radical do seu monômero, acetato de vinila, formando o acetato de polivinila, seguindo por uma reação de hidrólise (VANJERI et al., 2019; AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020; VECCHI et al., 2021). Sua cadeia principal é composta por carbonos e grupos hidroxilas nas laterais (Figura 12). É um polímero com ampla utilização para a formação de filmes devido a características como boa resistência mecânica, solubilidade em água e capacidade de reter uma grande quantidade de líquido, elasticidade, integridade estrutural e boas propriedades adesivas (KANATT et al., 2012; AYCAN; YAYLA; AYDIN, 2020; VECCHI et al., 2021).



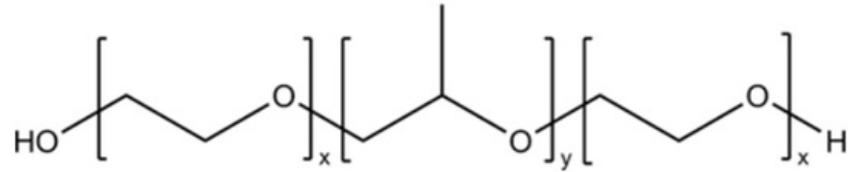
**Figura 12.** Fórmula estrutural do PVA.

Além de ser excelente formador de filmes, o PVA vem sendo utilizado em vários sistemas de liberação sustentada de fármacos, indústria de materiais cirúrgicos, preparação de membranas e indústria de cosméticos (VANJERI et al., 2019).

### 3.5.1.3 Poloxamer<sup>®</sup>407

O Poloxamer<sup>®</sup>407 é um copolímero não iônico, sintético, biocompatível, anfifílico, constituído por tribloco; um bloco hidrofóbico de polioxipropileno (POP) entre dois blocos hidrofílicos de polioxietileno (POE), conforme pode ser observado na Figura 13 (GU; ALEXANDRIDIS, 2004; DUMORTIER et al., 2006; GIULIANO et al., 2018). Possui peso molecular de aproximadamente 12.600 Da e excelentes propriedades gelificantes termorresponsivas, sendo solúvel em água fria (4-8 °C), por conta uma camada de hidratação que envolve suas moléculas. Com o aumento da temperatura, as moléculas do polímero em solução agregam-se em micelas, que apresentam caráter hidrofóbico em seu interior e

hidrofílico em seu exterior (DUMORTIER et al., 2006; VECCHI et al., 2021).



**Figura 13.** Fórmula estrutural do Poloxamer<sup>®</sup>407.

Esse polímero tem sido utilizado na formação de blendas poliméricas e a sua presença pode modificar o comportamento da matriz, liberação do fármaco, intumescimento, mucoadesão e reologia (VECCHI et al., 2021).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Reagentes e insumos

Padrão de curcumina ( $\geq 99,0\%$ , It: WXBD2042V) e ácido fosfórico foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Matéria-prima de curcumina para produção dos filmes foi adquirida da Florien (Rio de Janeiro, Brasil) e padronizada em relação ao padrão de referência. Os solventes utilizados nas análises cromatográficas, como acetonitrila e etanol foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil). Para o preparo dos filmes foram utilizados PVA, quitosana de médio peso molecular e Poloxamer<sup>®</sup>407 da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e propilenoglicol da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil). Dimetilsulfóxido e Tween<sup>®</sup>80 foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil), e ácido acético e acetato de sódio da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As correções de pH foram realizadas com hidróxido de sódio da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, 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) e para o preparo de tampão para o meio receptor foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), Tween<sup>®</sup>80 da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil) e tampão HEPES da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A técnica de *tape-stripping* foi realizada usando a fita Scotch no. 845 Book Tape (3M, St. Paul, Estados Unidos da América). Para o teste de mucoadesividade foi utilizada mucina da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Filtros pré-limpos de diâmetro 22 mm e poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , hidrofóbicos e hidrofílicos, foram adquiridos de Analítica (São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas utilizando água ultrapurificada (Millipore, Illkirch- Graffenstaden, França).

Para cultivo das células foram obtidos meios de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco), DMEM/F12 (meio de Eagle modificado por Dulbecco/Mistura de nutrientes de Ham F-12) e RPMI da Sigma-Aldrich (St Louis, Estados Unidos da América), soro fetal bovino da Gibco (Paisley, Reino Unido), penicilina, estreptomicina e hidrocortisona da Gibco (Grand Island, Estados Unidos da América), EDTA da Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil) e tripsina da Gibco (Stratford, Canadá). Para o teste de viabilidade celular foram obtidos isopropanol da Dinâmica Química Contemporânea Ltda.

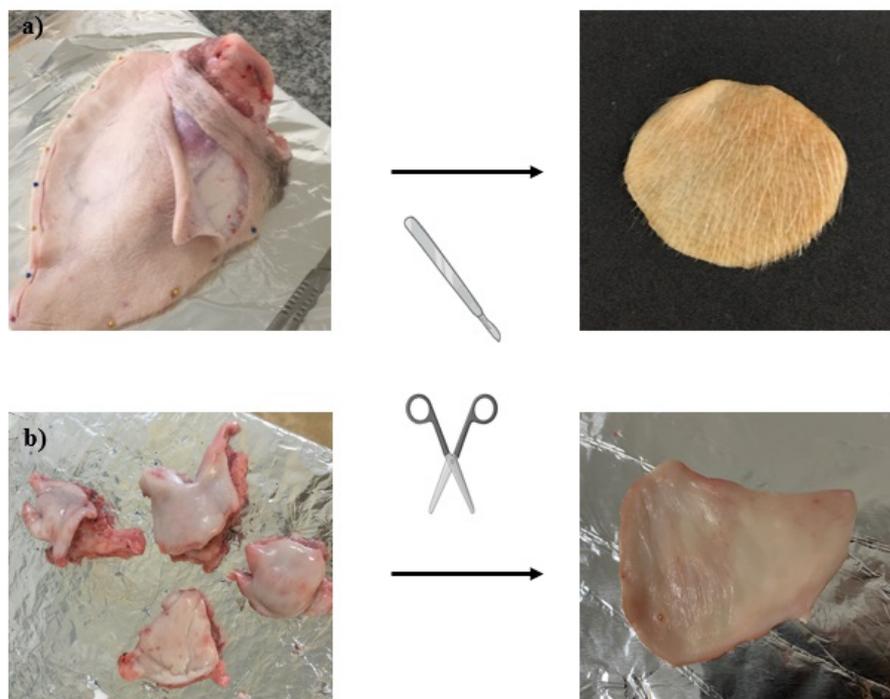
(São Paulo, Brasil), ácido cloclídrico da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), e MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) da Sigma-Aldrich (St Louis, Estados Unidos da América).

#### 4.1.2 Obtenção da pele e mucosa de suínos

As mucosas orais e as orelhas dos suínos foram gentilmente cedidas pelo Frigorífico Via Carnes (Formosa, Brasil). Os fragmentos de mucosas e as orelhas foram obtidos logo após o abate dos animais e antes da escalda, e foram transportados imediatamente para o laboratório sob refrigeração.

A mucosa foi umedecida com tampão HEPES 10 mol/L, pH 7,4 durante o transporte para o laboratório e foi utilizada *ex vivo* no mesmo dia da coleta após remoção da camada adiposa abaixo dos tecidos de interesse.

A pele inteira foi removida da região externa da orelha com auxílio de um bisturi. Os fragmentos de pele foram separados da camada adiposa e muscular com o auxílio de uma tesoura e armazenados sob refrigeração para uso em até 1 mês após a coleta (Figura 14).



**Figura 14.** Processo de remoção da pele (a) e mucosa bucal (b) de suínos.

## 4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE CURCUMINA

A solução estoque de curcumina foi preparada na concentração de 100 µg/mL pela pesagem de 10 mg do ativo e dissolução em quantidade suficiente de etanol. Ela foi mantida em frasco âmbar e armazenada em geladeira até o momento de sua utilização.

## 4.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Inicialmente, uma solução de curcumina em etanol, na concentração de 7,5 µg/mL, obtida a partir da solução estoque foi analisada utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800) usando uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, para determinar o comprimento de onda de maior absorção para ser utilizado nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### 4.3.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de CLAE, modelo LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japão), composto por quatro bombas (modelo LC 20-AT), forno (modelo CTO-20A), detector DAD espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e injetor automático de amostras (modelo SIL-20A). A aquisição e análise de dados foram realizadas usando o software Shimadzu LC. Como fase estacionária foi utilizada coluna C<sub>18</sub> de fase reversa de dimensões 25 cm × 4,6 mm, 5 µm (Discorery<sup>®</sup>, Supelco, Alemanha). Como fase móvel, foi utilizado ácido fosfórico a 1 mmol/L pH 3,0 e acetonitrila, eluindo a uma vazão de 1,0 mL/min. Ajustes na proporção dos solventes da fase móvel foram necessários para obtenção de um pico livre de interferentes da pele e mucosa e de outros de curcuminoides que estavam em pequena proporção na matéria-prima curcumina. O forno da coluna foi mantido a 40 °C durante todas as análises e a curcumina foi detectada por absorbância a 424 nm. O volume de injeção de cada amostra foi de 10 µL.

### 4.3.2 Preparo de extratos das camadas de pele e de mucosa

Para obter os extratos das camadas da pele (estrato córneo e pele remanescente), um fragmento de 2 cm<sup>2</sup> da pele suína foi fixado em um suporte de isopor e o estrato córneo foi retirado com o auxílio de 15 fitas adesivas. As fitas foram colocadas em um frasco de vidro. Em seguida, a pele restante foi cortada em pequenos pedaços com uma tesoura e colocada em

outro frasco de vidro. Então, 5 mL de etanol foram adicionados a cada um dos frascos.

O extrato de mucosa foi obtido cortando fragmentos de 2 cm<sup>2</sup> em pequenos pedaços com uma tesoura e colocando-os em frascos de vidro também com 5 mL de etanol.

Todos os frascos foram mantidos sob agitação durante a noite e filtrados em membranas de 0,22 µm. Esses extratos foram armazenados em geladeira ( $\pm 4$  °C) para serem analisados pelo método desenvolvido por CLAE.

#### **4.3.3 Otimização da extração do fármaco das camadas da pele e mucosa**

Diferentes condições de extração da curcumina a partir das camadas da pele (estrato córneo e pele remanescente) e mucosa foram testadas para obter as melhores porcentagens de recuperação do ativo a partir dessas matrizes biológicas. As condições foram testadas em triplicata cada uma.

Para o estrato córneo, 37,5 µg de curcumina solubilizada em etanol foram aplicadas às fitas contendo o estrato córneo, obtido conforme descrito na seção 4.3.2. Após total evaporação do solvente, 5 mL de etanol foram adicionados a cada amostra. As amostras foram então deixadas sob agitação constante (300 rpm) por 24, 48 ou 120 h, filtradas em membrana de 0,22 µm e então levadas para quantificação do fármaco em CLAE para posterior cálculo da porcentagem de recuperação.

Para a pele remanescente, 37,5 µg de curcumina solubilizada em etanol foram aplicados aos fragmentos de pele. Após total evaporação do solvente, 5 mL de diferentes solventes de extração (DMSO, etanol, ácido acético: etanol [50:50, v/v), Tween<sup>®</sup>80: etanol (50:50, v/v), DMSO: etanol (50:50, v/v) e ácido acético: Tween<sup>®</sup>80 (50:50, v/v)] foram adicionados aos fragmentos de pele contaminados com a concentração conhecida do fármaco. Depois de avaliado qual seria o melhor meio extrator (DMSO), novas amostras contendo 37,5 µg de curcumina foram deixadas sob agitação constante (300 rpm) com 5 mL do meio extrator por 4, 24, 48, 120 e 240 h. Posteriormente, cada amostra foi filtrada em membrana de 0,22 µm e levadas para quantificação do fármaco em CLAE, para posterior cálculo da porcentagem de recuperação. Por fim, foi realizado um processo adicional de extração, no qual após a primeira extração, os fragmentos de pele passaram por uma segunda extração com substituição do DMSO por etanol (5 mL) por mais 48 h sob agitação.

Para a mucosa, a melhor condição para a extração do fármaco a partir da pele remanescente foi testada.

#### 4.3.4 Validação da metodologia analítica

A metodologia analítica para quantificação de curcumina extraída de mucosa e camadas da pele foi validada de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH) (ICH, 2005) avaliando-se os parâmetros seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez.

##### 4.3.4.1 Seletividade

Inicialmente foram preparadas soluções contendo os contaminantes da pele e mucosa de suínos, conforme item 4.3.2. Posteriormente, soluções de curcumina em etanol na concentração de 7,5 µg/mL, contendo ou não cada um dos contaminantes de pele ou mucosa foram preparadas e comparadas para verificar se o método seria capaz de identificar e quantificar o fármaco mesmo na presença desses interferentes. A análise foi realizada em triplicata para cada contaminante e a comparação entre as áreas dos picos do ativo e os tempos de retenção foi avaliada utilizando-se o teste t de *Student* ( $p < 0,05$ ).

##### 4.3.4.2 Linearidade

Alíquotas de diferentes volumes da solução estoque de curcumina foram diluídas em etanol para obter uma curva de calibração na faixa de concentração que foi de 1,0 µg/mL a 30 µg/mL (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 15,0 e 30,0 µg/mL). As curvas de calibração para a concentração *versus* a área do pico foram plotadas e ajustadas usando a regressão linear de mínimos quadrados, sendo utilizado como parâmetro de linearidade um coeficiente de correlação superior a 0,99 (ANVISA, 2017). Os fatores de resposta foram calculados considerando a razão entre a área do pico e a concentração do analito. Os resíduos foram estimados com base na diferença entre valores teóricos e experimentais, que foram calculados a partir da curva de calibração.

##### 4.3.4.3 LD e LQ

A concentração mínima de curcumina a ser detectada e quantificada com precisão e exatidão (LD e LQ, respectivamente) foi calculada com base no desvio padrão da média do intercepto com o eixo Y (DP) e na inclinação da curva de calibração (IC), a partir das três curvas de calibração preparadas conforme descrito na seção 4.3.4.2, de acordo com as Equações I e II.

$$LD = 3,3 \times DP \div IC \text{ (Equação I)}$$

$$LQ = 10 \times DP \div IC \text{ (Equação II)}$$

Para confirmação do limite de quantificação teórico, foram preparadas soluções de concentrações de curcumina próximas ao valor teórico encontrado e então os resultados foram avaliados quanto a precisão e exatidão das três replicatas analisadas, considerando que o limite de quantificação de um analito é a menor concentração quantificável com valores de precisão e exatidão aceitáveis.

#### 4.3.4.4 Precisão

A precisão do método foi determinada pela repetibilidade instrumental e precisão intermediária do equipamento. A repetibilidade foi determinada utilizando amostras em três diferentes concentrações (2,5, 7,5 e 30,0 µg/mL) de curcumina em três repetições de cada em um curto período. A precisão intermediária foi avaliada em dois dias diferentes (inter-dia), em equipamentos diferentes, por analistas diferentes, nas mesmas concentrações que a repetibilidade. As concentrações de curcumina foram determinadas e os coeficientes de variação (CV) foram calculados de acordo com a Equação III:

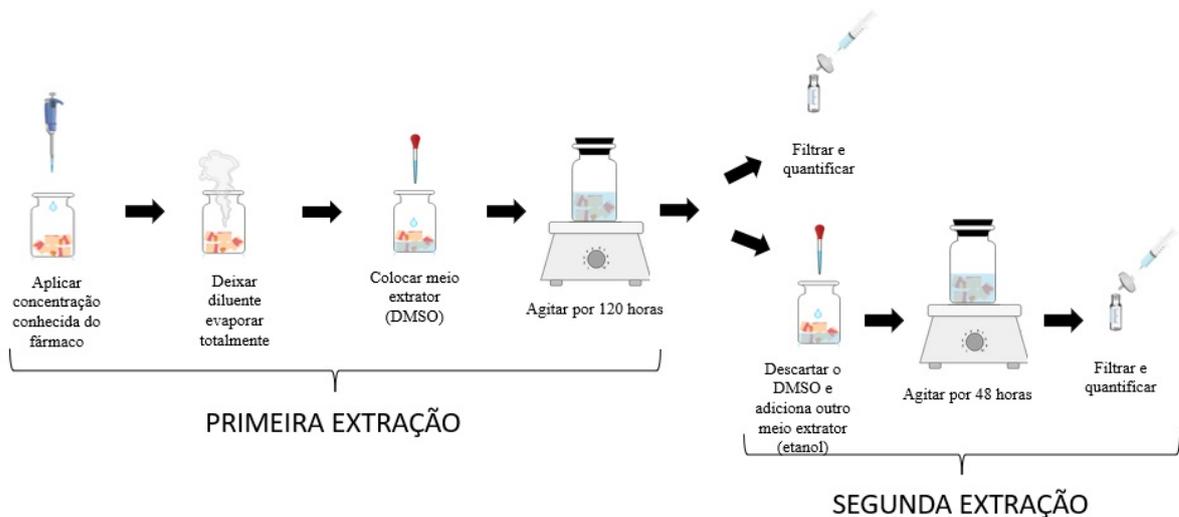
$$CV = (\text{desvio padrão da média} \div \text{concentração média}) \times 100 \text{ (Equação III)}$$

#### 4.3.4.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em termos de porcentagem de curcumina recuperada a partir de amostras biológicas (estrato córneo, pele remanescente e mucosa) contaminadas com quantidade conhecida do fármaco utilizando, para isso, o método de extração otimizado. Para isso, cada camada da pele ou mucosa foi contaminada com quantidades de curcumina que, após extração com etanol, dando origem a três soluções de curcumina em três diferentes concentrações teóricas (2,5, 7,5 e 30,0 µg/mL).

Primeiramente, as camadas da pele (estrato córneo e pele remanescente) foram separadas conforme descrito no item 4.3.2. As fitas contendo o estrato córneo foram colocadas em frasco âmbar. A pele remanescente e a mucosa foram cortadas em pequenos pedaços com tesoura e colocados em frasco âmbar. Alíquotas da solução estoque de curcumina (massa equivalente a 12,5, 37,5 e 150,0 µg de curcumina) foram aplicadas na superfície das diferentes camadas da pele e mucosa, em triplicata para cada camada e concentração testada. O solvente

foi completamente evaporado e 5 mL de DMSO e etanol foram adicionados à pele remanescente ou mucosa e estrato córneo, respectivamente. Cada frasco contendo as camadas da pele ou mucosa foi mantido sob agitação magnética (300 rpm) por 120 h. Após esse período, as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm. O restante de DMSO foi descartado e uma segunda extração foi realizada somente para a pele remanescente e mucosa, substituindo o DMSO por 5 mL de etanol e mantendo-se os respectivos frascos sob agitação magnética (300 rpm) por mais 48 h e filtrada através de uma membrana de 0,22 µm (Figura 15).

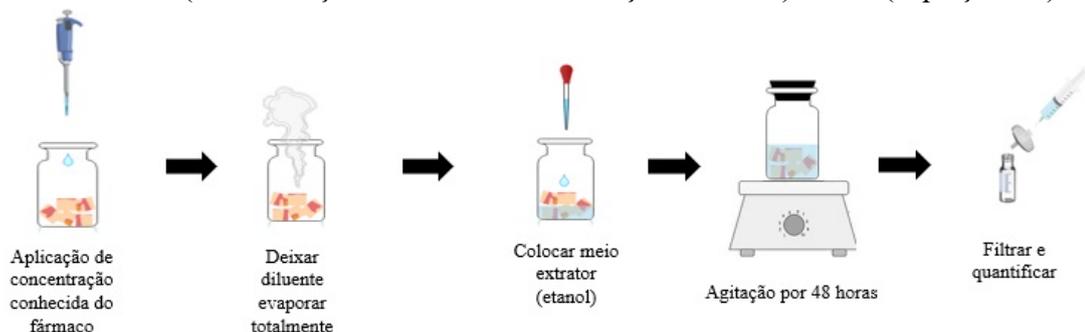


**Figura 15.** Representação técnica do método de extração aplicado à pele remanescente e mucosa para a recuperação da curcumina nesses tecidos. Fonte: Autoria própria.

Para o estrato córneo, os fragmentos da fita em etanol foram mantidos sob agitação magnética (300 rpm) por 48 h. Após esse período, as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm (Figura 16).

Por fim, todas as amostras foram analisadas pelo método cromatográfico descrito acima. A exatidão foi relatada como uma porcentagem de curcumina recuperada das camadas da pele e mucosa, de acordo com a Equação IV:

$$\text{Exatidão} = (\text{concentração medida} \div \text{concentração nominal}) \times 100 \text{ (Equação IV)}$$



**Figura 16.** Representação técnica do método de extração aplicado ao estrato córneo para a recuperação da curcumina. Fonte: autoria própria.

Para a pele remanescente e mucosa, em que se realizou uma dupla extração, foram somadas as porcentagens de curcumina obtidas das duas etapas de extração.

#### 4.3.4.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada com variações intencionais em quatro importantes parâmetros cromatográficos de análise. Os parâmetros selecionados foram de pH da fase móvel ( $\pm 2,0$ ), variação na composição da fase móvel ( $\pm 2,0\%$ ), temperatura do forno ( $\pm 2,0$  °C), e vazão da fase móvel ( $\pm 0,1$  mL/min). Todos os ensaios foram realizados com amostras de curcumina 7,5 µg/L em triplicata. Os parâmetros de adequação do sistema, como resolução, pratos teóricos e fator de simetria, foram então avaliados, juntamente com a área do pico e o tempo de retenção. O modelo foi validado seguindo a ANOVA com nível de significância de 0,05.

#### 4.4 SOLUBILIDADE DA CURCUMINA

A solubilidade da curcumina foi determinada nos seguintes solventes: tampão fosfato pH 6,8; tampão fosfato pH 5,5; tampão fosfato pH 5,5 com 5 % de Tween<sup>®</sup>80; tampão fosfato pH 5,5 com 3% de Tween<sup>®</sup>80; tampão fosfato pH 5,5 com 2% de Tween<sup>®</sup>80; tampão fosfato pH 5,5 com 1% de Tween<sup>®</sup>80; e tampão fosfato pH 5,5 com 0,5 % de Tween<sup>®</sup>80. A escolha dos solventes foi realizada considerando-se o alto log P do fármaco [log P: 3,29 (LESTARI; INDRAYANTO, 2014; JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020)], que é uma medida quantitativa da lipofilicidade. Assim, a frascos âmbar com tampa foram adicionados 3 mL dos solventes apresentados. Aos diferentes solventes foi adicionada uma quantidade do fármaco suficiente para formar corpo de fundo por um período de 15 min sob agitação constante. Após 48 h sob temperatura ambiente e agitadas a 700 rpm, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 min. Em seguida, as alíquotas sobrenadantes das amostras foram diluídas, se necessário. Posteriormente as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm e levadas para análise seguindo o método por CLAE. O ensaio foi realizado em triplicata para cada sistema de solvente analisado.

#### 4.5 ESTABILIDADE DA CURCUMINA NOS SOLVENTES

A estabilidade analítica foi avaliada a partir de medidas quantitativas do fármaco durante um período de 24 h. Foram utilizados os seguintes meios: etanol, tampão fosfato pH 7,4:etanol

(80:20, v:v), tampão fosfato pH 6,8:etanol (80:20, v:v); tampão fosfato pH 5,5:etanol (80:20, v:v) e tampão fosfato pH 5,5 com 0,5% de Tween<sup>®</sup>80. As análises foram realizadas seguindo o método validado por CLAE, em triplicata, no tempo inicial, após 6 h e após 24 h do preparo. A estabilidade foi relatada como uma porcentagem de curcumina presente ao final de cada período, em relação à quantificação inicial.

#### 4.6 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE A CURCUMINA E EXCIPIENTES

##### 4.6.1 Preparo das amostras

Para o estudo de compatibilidade foram utilizadas análises individuais de cada um dos componentes (curcumina, quitosana, Poloxamer<sup>®</sup>407, propilenoglicol e PVA) e misturas físicas binárias de curcumina com cada um dos excipientes, conforme descrito na Tabela 1. O estudo foi realizado por meio da análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria de varredura diferencial (DSC) das amostras.

**Tabela 1.** Composição das misturas físicas da curcumina e dos demais componentes dos filmes para realização do estudo de compatibilidade.

Misturas	Composição (% p/p)				
	Curcumina	Poloxamer <sup>®</sup> 407	PVA	Quitosana	Propilenoglicol
M1	50	50	-	-	-
M2	50	-	50	-	-
M3	50	-	-	50	-
M4	50	-	-	-	50
M5	50	-	16,7	16,7	16,7
M6	50	16,7	16,7	16,7	-
M7	50	12,5	12,5	12,5	12,5

##### 4.6.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A TGA foi realizada em um DTG-60H (Shimatzu, Japão). Foi utilizada uma taxa de aquecimento das amostras de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, em um intervalo de aquecimento de 40 a 500 °C. Todas as medições térmicas foram realizadas usando o software TA-60 Shimadzu<sup>®</sup>.

### 4.6.3 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

A análise de DSC foi realizada em um DSC-60 (Shimadzu<sup>®</sup>, Tokyo, Japão). Foi utilizada uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, em um intervalo de aquecimento de 30 a 200 °C. Todas as medições térmicas foram realizadas usando o software TA-60 Shimadzu<sup>®</sup>.

## 4.7 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO CURCUMINA

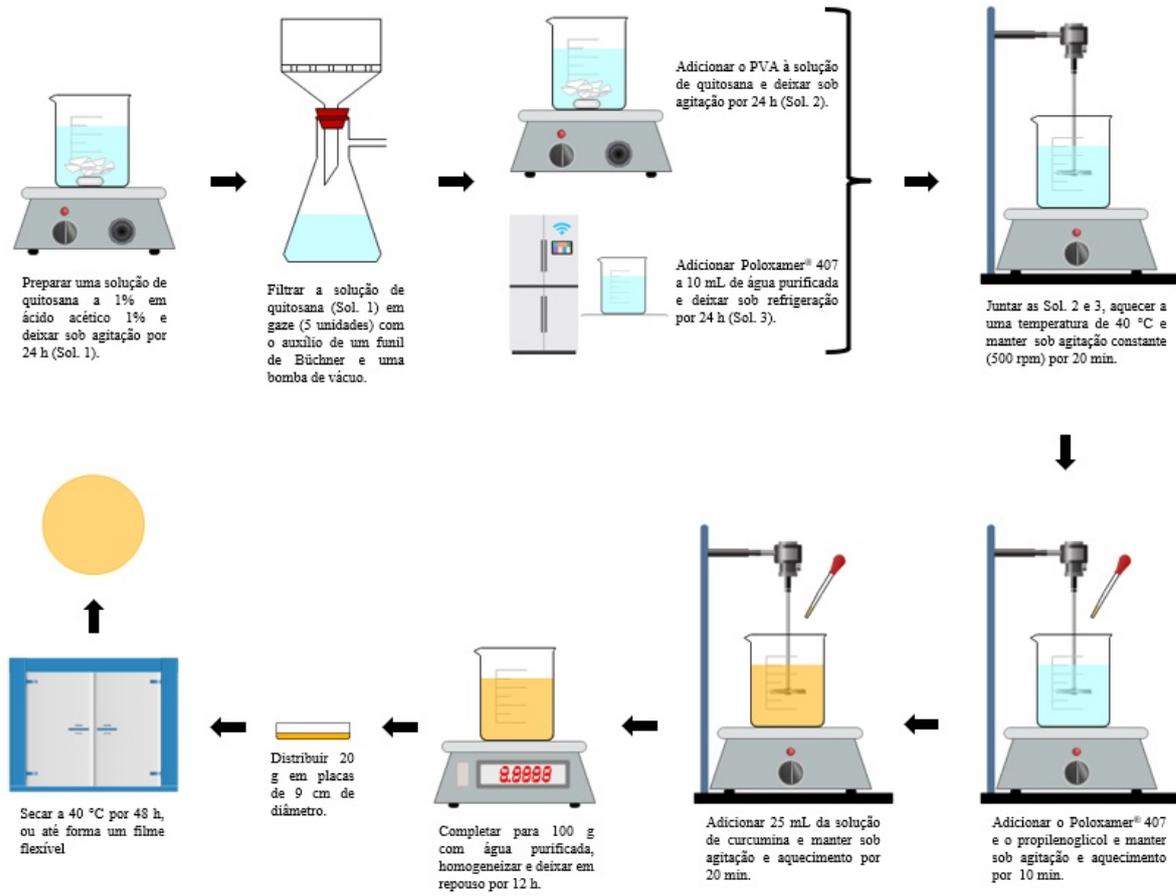
### 4.7.1 Obtenção dos filmes

Os filmes foram obtidos a partir de dispersões poliméricas de base aquosa pela técnica de evaporação de solvente. Considerando a baixa solubilidade da curcumina em meio aquoso, foram produzidas formulações em três concentrações diferentes de curcumina. Inicialmente foram elaboradas cinco formulações a partir de uma solução de curcumina a 2 mg/mL em etanol (FA-10, FB-10, FC-10, FD-10 e FE-10), chegando a uma concentração final de 157,3 µg/cm<sup>2</sup> no filme seco. Posteriormente foram produzidos filmes com outras 2 concentrações de curcumina, uma delas a partir de uma solução a 0,4 mg/mL em etanol (FA-2, FB-2, FC-2 e FD-2), chegando a uma concentração final de 31,5 µg/cm<sup>2</sup> e outra a partir de uma solução a 1,0 mg/mL em etanol (FA-5, FB-5, FC-5 e FD-5), chegando a uma concentração final de 78,6 µg/cm<sup>2</sup>. O objetivo desse teste foi obter filmes com a maior quantidade de curcumina incorporada mantendo as características desejáveis para esse tipo de formulação, como homogeneidade e ausência de precipitados. Para os demais constituintes foram utilizadas concentrações previamente fixadas de quitosana, Poloxamer<sup>®</sup>407, propilenoglicol e PVA, conforme proporção indicada na Tabela 2, para uma massa final de 100 g. Essas quantidades tomaram por base testes preliminares envolvendo desde a proporção de cada constituinte até otimização do processo de produção dos filmes.

**Tabela 2.** Proporção dos constituintes dos cinco filmes produzidos.

<b>Filme</b>	<b>Quitosana (%)</b>	<b>Poloxamer<sup>®</sup>407 (%)</b>	<b>Propilenoglicol (%)</b>	<b>PVA (%)</b>
FA	0,5	-	5,0	8,5
FB	-	1,0	5,0	8,5
FC	0,5	1,0	-	8,5
FD	0,5	1,0	5,0	8,5
FE	0,5	1,0	5,0	-

Os filmes foram produzidos conforme processo ilustrado na Figura 17, eliminando a etapa na qual o componente foi excluído da formulação. Portanto, inicialmente a quitosana foi adicionada ao ácido acético 1% e mantida sob agitação por 24 h para completa solubilização (FA, FC, FD, FE). Após esse período o conteúdo foi filtrado com o auxílio de um funil de Büchner, coberto com gaze, e acoplado a uma bomba de vácuo. O PVA foi adicionado a 50 mL da solução de quitosana (FA, FB, FC, FD) ou a 50 mL de água purificada (FB) e mantido sob agitação por mais 24 h. Concomitantemente, foi adicionado o Poloxamer<sup>®</sup>407 a 10 mL de água purificada e deixado sob refrigeração por 24 h. Posteriormente o conteúdo contendo o PVA e a quitosana foi mantido a 40 °C sob agitação (500 rpm) por 20 minutos para adição da solução contendo o Poloxamer<sup>®</sup>407 (FB, FC, FD, FE) e propilenoglicol (FA, FB, FD, FE) e foi mantida a agitação por mais 10 minutos. Finalmente foram adicionados 25 mL da respectiva solução de curcumina em etanol (2,0, 1,0 e 0,4 mg/mL). A solução foi mantida sob agitação, a 40 °C, por 20 min e posteriormente, com o auxílio de uma balança, a massa foi completada com água purificada até 100 g e homogeneizada. A solução foi deixada em repouso por 12 h para eliminação das bolhas e após esse período, a solução foi distribuída (20 g) em placas de petri de 9 cm de diâmetro e levadas para estufa à temperatura 40 °C por 48 h ou até que um filme flexível fosse formado.



**Figura 17.** Representação técnica do preparo dos filmes contendo curcumina. Fonte: autoria própria.

Ao final do processo o filme foi cuidadosamente retirado da placa de Petri e levado para avaliação inicial, seguido da caracterização dos filmes que atenderam aos requisitos inicialmente propostos, como formação de filme íntegro, flexível, com ausência de bolhas, rachaduras ou precipitados.

#### 4.7.2 Caracterização dos filmes

Os filmes secos foram cuidadosamente removidos da placa e caracterizados quanto ao aspecto, peso, espessura, resistência à dobradura, pH, doseamento, índice de intumescimento, força de ruptura, mucoadesividade e morfologia, de acordo com as metodologias descritas abaixo.

##### 4.7.2.1 Aspecto

O filme foi avaliado quanto à cor, presença de rachaduras, bolhas ou precipitados e flexibilidade aparente.

#### 4.7.2.2 Peso e espessura

Para o peso, os filmes foram retirados da placa e pesados individualmente em balança analítica (Modelo: AUY220, Shimadzu, Kyoto, Japão). Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão da média (ARAFA et al., 2018). A uniformidade da espessura foi avaliada com a medida em 5 pontos diferentes de cada filme por meio de um paquímetro digital marca Mitutoyo (Japão) (ARAFA et al., 2018) Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão da média.

#### 4.7.2.3 Resistência à dobradura

A verificação da resistência à dobradura avalia a flexibilidade do filme e foi realizada dobrando um pedaço do filme no mesmo local, em um ângulo de 180°, até a quebra ou 300 vezes, o que ocorresse primeiro (NAIR et al., 2013; ARAFA et al., 2018). O teste foi realizado em triplicata para cada filme.

#### 4.7.2.4 pH

A determinação do pH foi realizada utilizando um potenciômetro calibrado (Modelo MPA- 210, MS-Tecnopon, São Paulo, Brasil) em um pedaço do filme (2 × 2 cm) solubilizado em água purificada. Para solubilização, o fragmento de filme disperso em água foi deixado sob agitação magnética até sua completa desintegração (ARAFA et al., 2018). O teste foi realizado em triplicata e resultados foram expressos pela média e desvio padrão da média.

#### 4.7.2.5 Determinação do conteúdo de curcumina

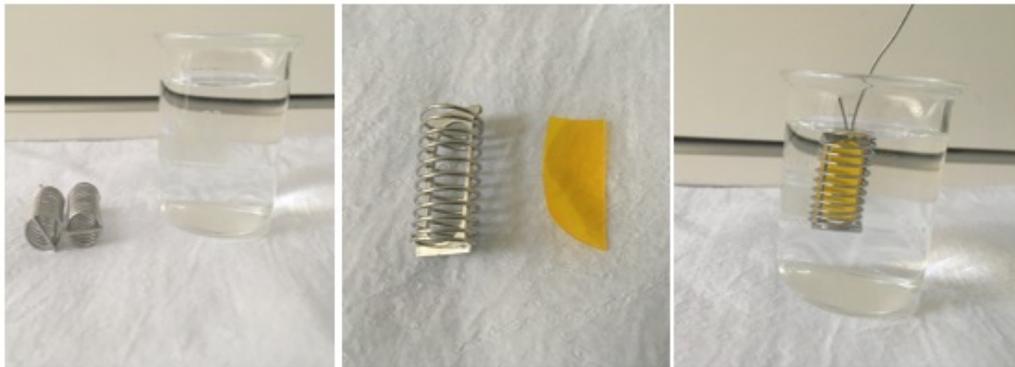
Um pedaço do filme (3 cm<sup>2</sup>) foi picotado em pequenos pedaços e estes adicionados a um balão volumétrico de 25 mL. Ao balão foram acrescentados 5 mL de água purificada e deixado sob agitação magnética (300 rpm) *overnight*. Posteriormente foram adicionados 15 mL de etanol e deixado sob agitação por mais 24 h. A barra magnética foi retirada e foi incluído etanol até completar o volume do balão volumétrico. A amostra foi filtrada em membrana 0,22 µm e levada para quantificação em CLAE, conforme metodologia previamente validada.

#### 4.7.2.6 Índice de intumescimento

Para esse teste foi utilizado um *sinker* espiral (mola), conforme apresentado na Figura

18, dentro do qual foi inserido um pedaço do filme (2 cm<sup>2</sup>). Ambos foram pesados separadamente em balança analítica antes do experimento. O *sinker* contendo o filme foi mergulhado em um béquer contendo 50 mL de água purificada e mantido à temperatura ambiente. A cada intervalo de tempo pré-estabelecidos (1, 2, 3, 4 e 5 min) o *sinker* contendo o filme foi retirado com auxílio de pinça, cuidadosamente enxugado, e posteriormente repesado. O mesmo procedimento foi adotado em triplicata para todas as outras amostras (BASKAR; SAMPATH KUMAR, 2009). O ganho de água (li%) foi calculado de acordo com a Equação V:

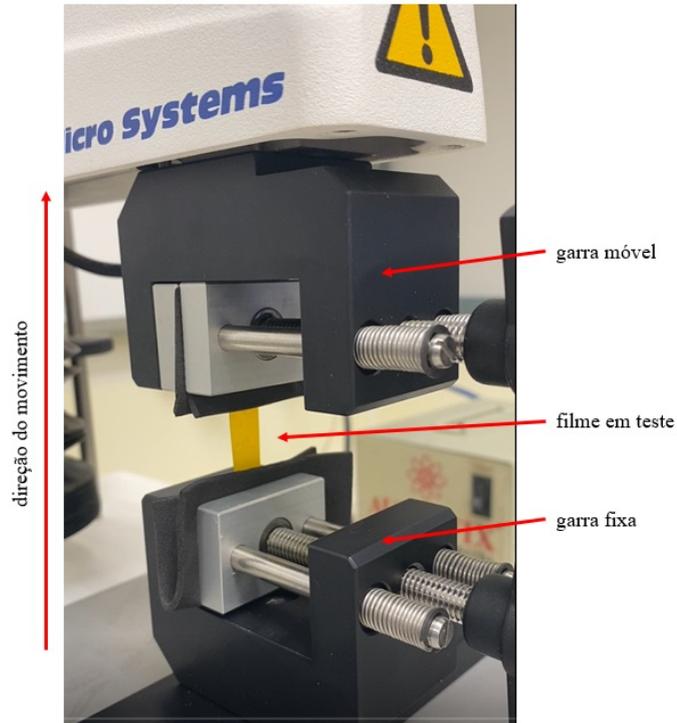
$$li\% = (\text{Peso Final}) \div (\text{Peso inicial}) \times 100 \text{ (Equação V)}$$



**Figura 18.** Representação do ensaio de intumescimento dos filmes.

#### 4.7.2.7 Força de ruptura

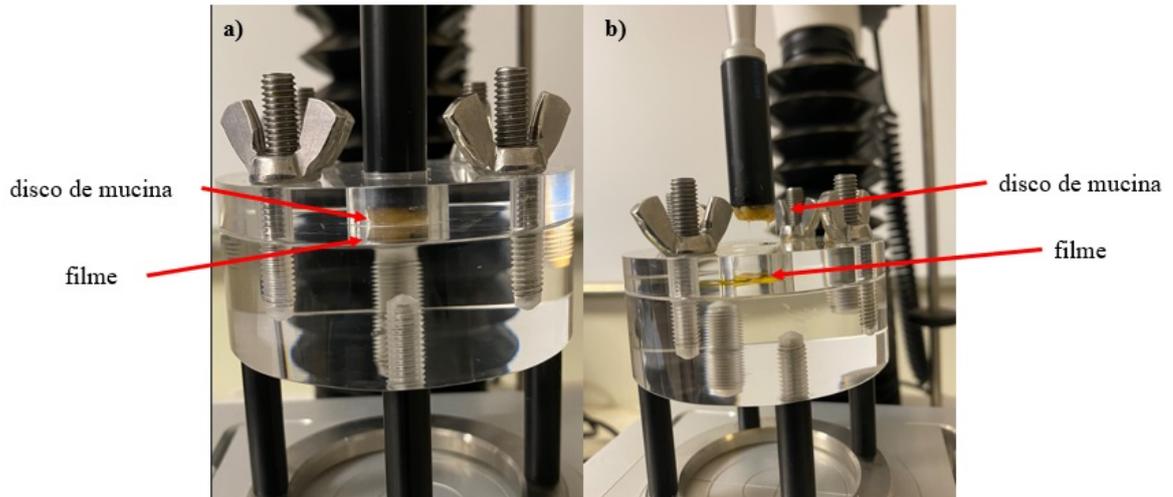
O teste de ruptura, que avaliou a força necessária para romper os filmes preparados, foi realizado utilizando um texturômetro TA-XTplus (Stable Micro Systems, Reino Unido). Tiras do filme (50 × 10 mm) foram cortadas e presas em cada uma das extremidades do equipamento (15 mm), restando 20 mm entre as duas garras, conforme apresentado na Figura 19. Nesse ensaio, uma das garras ficou fixada em uma base imóvel e a outra garra fixada no braço móvel do equipamento, que operou a uma velocidade de 2 mm/s até a ruptura da amostra (VECCHI et al., 2021). O teste foi realizado em triplicata e resultados foram expressos pela média e desvio padrão da força necessária para romper cada filme.



**Figura 19.** Módulo de força de tração do texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems) no momento da análise dos filmes desenvolvidos.

#### 4.7.2.8 Mucoadesividade

Esse ensaio foi realizado para avaliar a capacidade de adesão do filme à mucosa e é utilizado para analisar formulações principalmente para aplicação oral, nasal, ocular e vaginal (KHUTORYANSKIY, 2011). Para esse ensaio foram utilizados discos de mucina de 9 mm, que foram preparados a partir de 250 mg de mucina e 75  $\mu$ L de uma solução de mucina a 8% em água destilada. O equipamento utilizado foi um analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems), no modo de força de compressão. O disco de mucina foi preso à extremidade da sonda cilíndrica (10 mm de diâmetro) por meio de uma fita dupla face e hidratado por imersão em solução de mucina a 8% por 30 s. Após esse período, o líquido superficial foi removido (COSTA et al., 2023). Cada filme testado foi previamente cortado em pedaços de 2 cm<sup>2</sup> e embebido em água destilada por 60 s, imediatamente antes do teste, e então o filme foi preso ao suporte de acrílico. A probe contendo o disco de mucina foi então movida para baixo para entrar em contato com o filme e uma força de 0,2 N foi aplicada durante 60 s (Figura 20). Finalmente a probe foi retirada a uma velocidade constante de 0,5 mm/s e a força máxima necessária para separar o disco de mucina do filme foi determinada pelo software do equipamento Texture Exponent Lite (EQUANI et al., 2001; THIRAWONG et al., 2007). O teste foi realizado em triplicata para cada filme e resultados foram expressos pela média e desvio padrão da média.



**Figura 20.** Módulo de mucoadesividade do texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems). (a) momento de contato entre o disco de mucina e o filme. (b) momento de deslocamento do disco de mucina.

#### 4.7.2.9 Morfologia

A morfologia dos filmes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV JOEL, JSM-7000 IF). Para a análise no MEV, cada filme contendo o fármaco ou não (branco) foi colocado em uma fita condutora de carbono, na posição vertical, fixada em um suporte. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em aumentos de  $5000\times$ .

#### 4.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade dos filmes foi conduzido utilizando amostras em triplicata para cada um deles, armazenadas em sachês de alumínio em temperatura ambiente e a  $40 \pm 3$  °C. O estudo teve como finalidade avaliar aparência, peso, espessura, pH e teor de curcumina, nos períodos predeterminados de 0, 7, 30, 60 e 90 dias. Dessa forma, ao final de cada período, as amostras eram retiradas da embalagem, fotografadas e analisadas conforme procedimento de cada parâmetro definido.

#### 4.9 ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO DE CURCUMINA A PARTIR DOS FILMES

O perfil de liberação da curcumina a partir dos filmes desenvolvidos foi obtido por meio de um sistema de difusão Phoenix DB-6 (Teledyne Hanson) (Figura 21 e 22). Esse equipamento acopla células de difusão vertical e fornece controle de aquecimento e agitação de maneira uniforme e precisa.



Figura 21. Sistema de difusão Phoenix DB-6 (Teledyne Hanson).



Figura 22. Célula de difusão e seus componentes.

Para a realização desse ensaio, um pedaço de 2 cm<sup>2</sup> de cada filme foi recortado e acoplado ao suporte que fica em contato com o meio receptor. Então, o compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de tampão fosfato pH 5,5 com 0,5% de Tween<sup>®</sup>80 (garantindo a manutenção das condições *sink*). Durante todo o experimento, a temperatura foi mantida a 37 °C, a agitação do meio receptor foi de 300 rpm por um período de 24 h.

Amostras da solução receptora foram coletadas nos tempos 1, 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 e 24 h. A cada coleta, uma alíquota de 1 mL era retirada do meio receptor e igual volume do tampão fosfato pH 5,5 com 0,5% de Tween<sup>®</sup>80 era imediatamente repostado. As amostras foram filtradas em membrana com porosidade de 0,22 µm. O experimento foi realizado em quintuplicata para cada formulação e a quantidade de fármaco liberada foi determinada por

CLAE-UV, de acordo com o método analítico validado.

O perfil de liberação da curcumina a partir dos filmes foi analisado e comparado entre eles por meio de métodos gráficos relacionando a porcentagem liberada de curcumina em função do tempo (h). A quantidade de fármaco liberada ( $\mu\text{g}$ ) para o meio receptor em função do tempo (h) foi calculada pela Equação VI:

$$Q_{\text{realt}} = C_{\text{mensurada}} \times V_r + V_a \times \sum^{(n-1)} C_a \text{ (Equação VI)}$$

onde:  $Q_{\text{realt}}$ , representa a quantidade real liberada acumulada no tempo  $t$ ;  $C_{\text{mensurada}}$  é a concentração mensurada dos fármacos no tempo  $t$ ;  $V_r$  é o volume do compartimento receptor (15 mL);  $V_a$  é o volume de amostra coletada (1 mL) e  $C_a$  é a concentração dos fármacos na amostra removida.

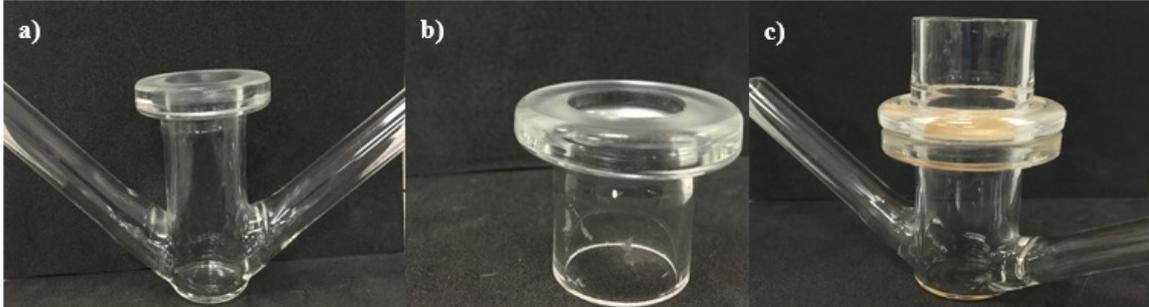
Os dados de liberação também foram utilizados para avaliar qual o modelo cinético de liberação os filmes seguiriam, por meio da avaliação do coeficiente de correlação linear obtido para cada um dos perfis. Foram avaliados os modelos matemáticos de ordem zero (porcentagem cumulativa do fármaco liberado *versus* tempo), modelo de *Higuchi* (porcentagem acumulada da liberação do fármaco *versus* raiz quadrada do tempo), modelo de primeira ordem (log da porcentagem acumulada do fármaco restante *versus* tempo), *Hixson Crowell* (está relacionado com a massa da molécula do fármaco inicialmente e no tempo  $t$  além da área superficial e o volume da molécula do fármaco) e *Weibull* (log da porcentagem liberada acumulada *versus* log do tempo).

#### 4.10 ENSAIOS *IN VITRO* DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA

##### 4.10.1 Ensaio estático

O ensaio estático de penetração cutânea *in vitro* foi realizado em quintuplicata para cada amostra, em pele e mucosa oral. O teste foi efetuado utilizando células de difusão vertical tipo *Franz*, medindo 1,5 cm de diâmetro na região de difusão, compartimento doador com capacidade para 2 mL e compartimento receptor com capacidade para 15 mL, conforme Figura 23. A pele e a mucosa oral foram posicionadas separando o compartimento doador e receptor com a superfície externa voltada para o meio doador. No compartimento doador, foram inseridas amostras dos filmes escolhidos a partir da avaliação inicial (FA-5, FC-5 e FD-5) embebidos com 100  $\mu\text{L}$  de água purificada. No compartimento receptor foram colocados 15 mL de tampão fosfato pH 5,5 com 0,5% de Tween<sup>®</sup>80. Para o controle, o compartimento doador

foi preenchido com 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de curcumina a 139  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em tampão fosfato pH 5,5 com 0,5% de Tween<sup>®</sup>80. As células foram mantidas sob agitação magnética constante a 300 rpm e em banho termostatzado a 32 °C por um período de 24 h.



**Figura 23.** Célula de difusão de Franz modificada. (a) compartimento receptor, (b) compartimento doador e (c) compartimento doador e receptor separado pelo tecido que será utilizado no experimento (pele ou mucosa).

Ao final do experimento, 1 mL da solução receptora foi coletado e analisado quanto ao conteúdo de curcumina. Cada fragmento de pele e mucosa foi removido da célula de difusão, colocado na posição vertical e recebeu a aplicação de água destilada por 5 s para remoção da formulação. Em seguida foi aplicado papel toalha para retirar o excesso de formulação e secar.

As amostras de pele foram colocadas horizontalmente em uma superfície plana, com o estrato córneo voltado para cima. Em seguida, o estrato córneo foi removido com a aplicação de 15 fitas adesivas de maneira sucessiva. Essas fitas foram colocadas em um frasco de vidro âmbar e então a pele remanescente foi cortada em pequenos fragmentos e colocada em outros frascos de vidro âmbar.

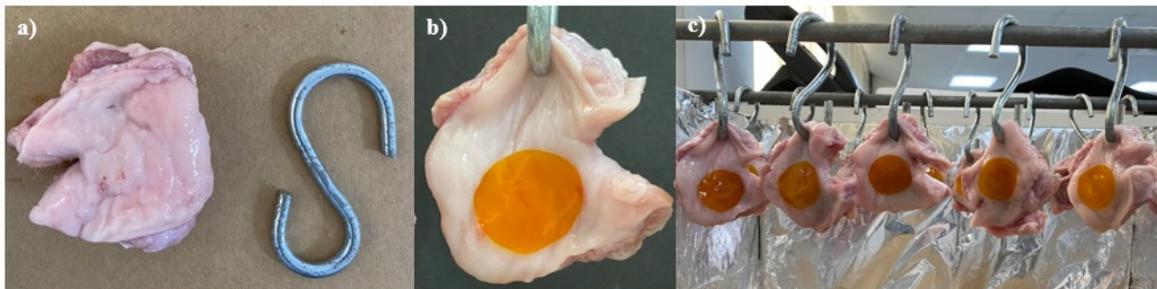
Em relação à mucosa, ela foi cortada em pequenos fragmentos e colocada em frasco de vidro âmbar.

O processo de extração do estrato córneo, da pele remanescente e da mucosa seguiram o protocolo descrito na seção 4.3.4.5. As respectivas soluções obtidas foram levadas ao CLAE para quantificação. Os resultados foram apresentados como quantidade de curcumina que penetrou cada camada da pele ou mucosa por  $\text{cm}^2$  de área analisada.

#### 4.10.2 Ensaio dinâmico em mucosa

O ensaio dinâmico de penetração em mucosa *in vitro* foi realizado em quintuplicata, em fragmentos de mucosa oral. Para que os fragmentos de mucosa ficassem na posição vertical, foi utilizado um suporte retangular com ganchos apoiados em uma estrutura de metal. Na posição horizontal, os ganchos foram inseridos nos fragmentos de mucosa, medindo aproximadamente 4  $\text{cm}^2$  (Figura 24). Ainda nessa posição, filmes medindo 1,5 cm de diâmetro, previamente

umedecidos em água purificada, foram aplicados, conforme demonstrado na Figura 24. Para o controle, 1 mL de uma solução de curcumina a 139  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em tampão fosfato pH 5,5 com 0,5% de Tween<sup>®</sup>80 foram aplicados ao fragmento de mucosa, deixando agir por 30 segundos. Posteriormente os ganchos foram apoiados à estrutura de metal para que ficassem na posição vertical (Figura 24). A cada 15 min de experimento, foram aplicados 1,0 mL de tampão fosfato pH 6,8 em cada fragmento para simular a salivação da mucosa oral. Os fragmentos foram mantidos nessa condição por um período de 12 h.



**Figura 24.** Permeação dinâmica em mucosa de suínos. a) Mucosa e gancho utilizado para manter a mucosa suspensa durante o experimento, b) Filme aplicado à mucosa, c) Mucosas suínas suspensas, com filmes aplicados, aguardando a aplicação de saliva artificial.

Ao final do experimento, os fragmentos foram retirados do suporte vertical e receberam aplicação de água destilada por 5 s para facilitar a remoção do filme. Em seguida foi aplicado papel toalha para retirar o excesso de formulação e secar.

As amostras foram colocadas horizontalmente em uma superfície plana, com a mucosa voltada para cima. Então a mucosa foi separada da camada adiposa e muscular com o auxílio de tesoura e bisturi, deixando apenas a região que foi submetida ao tratamento. Em seguida, ela foi cortada em pequenos fragmentos e colocada em frasco de vidro âmbar.

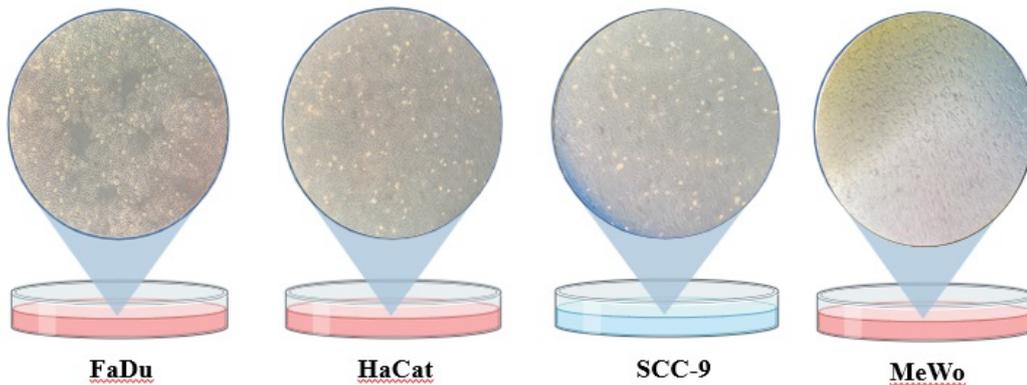
O processo de extração do fármaco seguiu o protocolo descrito na seção 4.3.4.5. As soluções obtidas foram levadas ao CLAE para quantificação. Os resultados foram apresentados como quantidade de curcumina que penetrou a mucosa por  $\text{cm}^2$  de área analisada.

## 4.11 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

### 4.11.1 Cultura de células

Para os experimentos de viabilidade celular foram utilizadas culturas de queratinócito humano imortalizado (HaCaT), carcinoma espinocelular de hipofaringe (FaDu), carcinoma espinocelular de língua (SCC-9) e melanoma metastático (MeWo) (Figura 25). A partir dessas linhagens que estavam armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ , foi realizado o cultivo dessas células em placas de 100 mm. Para as linhagens HaCaT e FaDu foi utilizado meio de cultura Dulbecco's Modified

Eagle's Medium (DMEM), suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e penicilina e estreptomicina a 1%. Para a linhagem SCC-9 foi utilizado meio de cultura DMEM suplementado com mistura de nutrientes Ham F12, na proporção de 1:1 (v/v), enriquecido com SFB a 10%, penicilina e estreptomicina a 1% e hidrocortisona a 400 ng/mL. Para a linhagem MeWo foi utilizado meio de cultura RPMI suplementado com 10% de FBS.

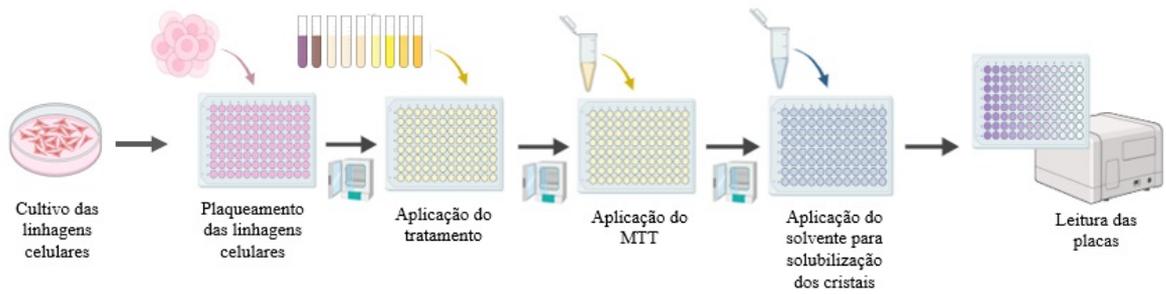


**Figura 25.** Cultura celulares utilizadas para o ensaio de viabilidade celular.

As células foram mantidas em incubadora úmida (MCO-170AICUVL-PA, PHC) com 5 % de CO<sub>2</sub> e 37 °C de temperatura. O meio de cultura foi substituído a cada dois dias, após lavagem com PBS. Sempre quando atingiam a confluência de aproximadamente 80% ou para a realização do experimento, as células eram desprendidas das placas com solução de 0,5% de tripsina e 5% de EDTA em PBS. Após serem desprendidas, a tripsina foi inativada com o meio de cultura e as células foram coletadas, contadas, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura e distribuídas para realização dos experimentos ou mantidas em placas de 100 mm para manutenção da cultura.

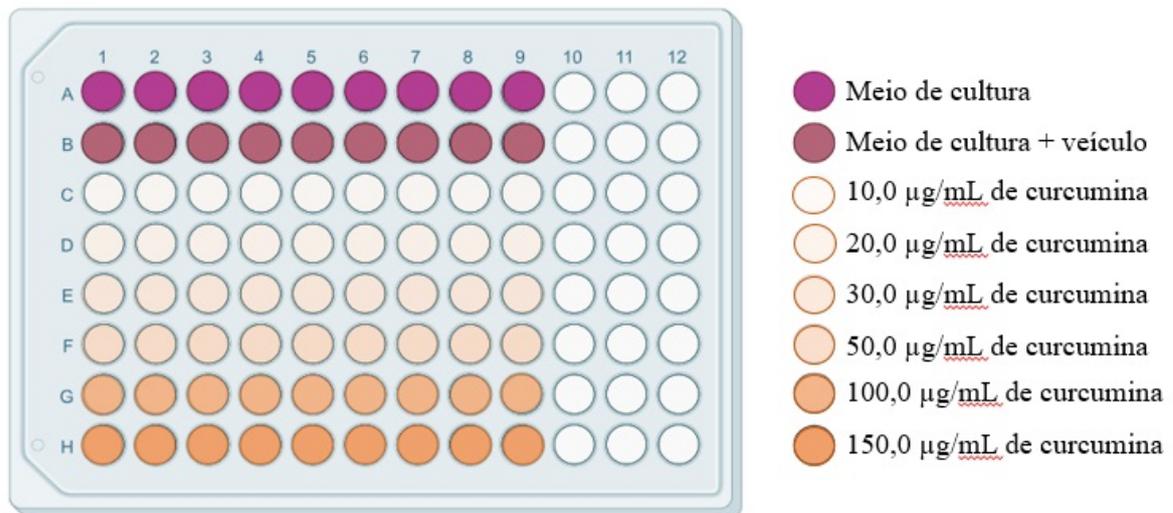
#### 4.11.2 Avaliação de citotoxicidade

O ensaio de redução do MTT é um método colorimétrico que mede indiretamente a citotoxicidade, proliferação ou viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Nesse ensaio o MTT, que é um sal solúvel em água e capaz de penetrar as membranas celulares migra para o interior das células onde é convertido pelas enzimas mitocondriais das células metabolicamente ativas em cristais de formazan. Esses cristais são solubilizados e a leitura da absorbância é feita por um espectrofotômetro (Figura 26) (CIAPETTI et al., 1993; BAHUGUNA et al., 2017).



**Figura 26.** Esquema do ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular.

Ao se obter um número suficiente para realizar o ensaio, as células foram desprendidas da placa de cultura, conforme procedimento descrito no item anterior, e ressuspensas em seu respectivo meio de cultura. Posteriormente, as linhagens celulares foram plaqueadas (100  $\mu$ L) em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço conforme planejamento apresentado na Figura 27.



**Figura 27.** Planejamento utilizado para realização da curva dose-resposta da curcumina nas linhagens celulares HaCaT, FaDu, SCC-9 e MeWo.

As placas foram mantidas em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C por 24 h. Após esse período, elas foram tratadas com diferentes concentrações de curcumina (10,0; 20,0; 30,0; 50,0; 100,0 e 150,0  $\mu$ g/mL), considerando os resultados obtidos na permeação, obtidas a partir de uma solução estoque de curcumina a 5 mg/mL em DMSO. Para isso, os meios de cultura foram substituídos por meios de cultura contendo as respectivas concentrações de curcumina. Então as placas retornaram para a incubadora por mais 24 h. Além dos poços contendo diferentes concentrações de curcumina, também foi aplicado um tratamento contendo apenas o DMSO (veículo), considerando a maior concentração utilizada na diluição

da solução estoque.

Após 24 h de tratamento, foram adicionados 10 µL de solução de MTT preparada na concentração de 5 mg/mL em PBS. As células voltaram para a incubadora ao abrigo da luz por mais 4 h. Após esse período, os meios de cultura contendo o tratamento e a solução de MTT foram cuidadosamente retirados. Os cristais formados a partir da conversão do MTT em formazam foram diluídos em 100 µL de isopropanol acidificado com ácido clorídrico e levados para agitação por 15 min. Por fim, foi verificada a absorbância por meio de uma leitora de microplaca (Multimode Detector, DTX 800, Beckman Coulter) a 570 nm. O cálculo da viabilidade celular (VC) foi realizado por meio da Equação VII abaixo:

$$VC = (A \times 100) \div B \text{ (Equação VII),}$$

onde: A = Absorbância de cada amostra que recebeu o tratamento ou o veículo (DMSO) e B = Absorbância das amostras que receberam apenas meio de cultura.

A partir da curva dose-resposta encontrada, foi calculada a IC<sub>50</sub>, que é a concentração necessária para induzir 50% de citotoxicidade celular. A partir da IC<sub>50</sub> da célula controle (HaCaT) e das células tumorais (FaDu, SCC-9 e MeWo) foi calculado o índice de seletividade tumoral (IST) por meio da Equação VIII abaixo:

$$IST = (IC_{50} \text{ da célula controle}) \div (IC_{50} \text{ da célula tumoral}) \text{ (Equação VIII)}$$

#### **4.11.3 Avaliação da citotoxicidade da curcumina associada à radioterapia**

Para avaliação da citotoxicidade da curcumina na presença de irradiação foram utilizadas as linhagens celulares HaCaT, FaDu, SCC-9 e MeWo. As linhagens celulares foram plaqueadas (100 µL) em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço. As placas foram mantidas em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C por 24 h. Após esse período, elas foram tratadas com concentrações de curcumina equivalentes à IC<sub>50</sub> de cada linhagem celular obtidas a partir de uma solução estoque de curcumina a 5 mg/mL em DMSO.

Após 1 h da aplicação do tratamento, todas as placas foram transportadas para a Unidade de Alta Complexidade em Oncologia do Hospital Universitário de Brasília (UNACON-HUB).

As placas que receberiam a irradiação foram submetidas a 4, 8 e 12 Gy de radiação ionizante, utilizando feixe linear de fótons de 6 MV, com acelerador linear Siemens Primus (Malvern, Pensilvânia, EUA), com o auxílio de placas de água sólida. Após 24 h da irradiação, foram aplicados 10 µL de uma solução de MTT a 5 mg/mL em cada poço. As placas foram protegidas da luz com papel alumínio e mantidas em incubadora úmida com 5 % de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 °C por 4 h. Ao final desse período, os cristais formados a partir da conversão do MTT em formazam foram diluídos em 100 µL de isopropanol acidificado com ácido clorídrico e levados para agitação por 15 min. Por fim, foi verificada a absorbância por meio de uma leitora de microplaca (Multimode Detector, DTX 800, Beckman Coulter) a 570 nm. O cálculo da viabilidade celular (VC) foi realizado por meio da Equação VII apresentada no item 4.13.2.

#### 4.12 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITATIVO DOS FILMES

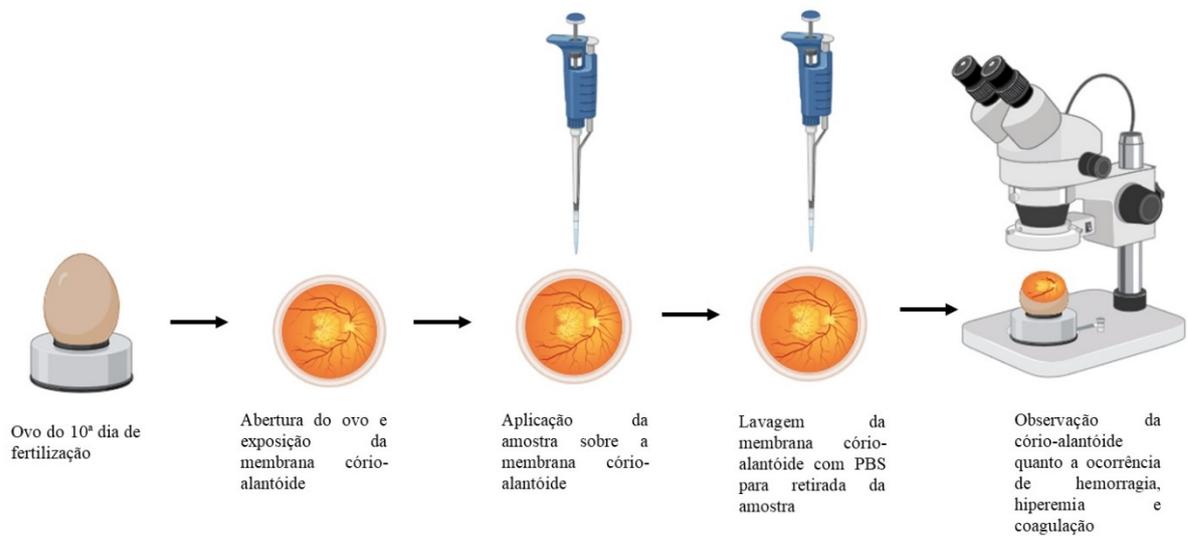
##### 4.12.1 Ensaio *in vitro* em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados (HET-CAM)

O ensaio em membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados, HET-CAM (*Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane*), foi aplicado para avaliar o grau de irritação às mucosas dos filmes desenvolvidos. Para o teste foram utilizados ovos no seu 10º dia de fertilização, mantidos a uma temperatura de  $37,8 \pm 1$  °C, cedidos pela Avifran (Planaltina, Brasil) e empregados nos ensaios no mesmo dia da coleta (LUEPKE, 1985).

Os ovos foram posicionados de forma que a câmara de ar ficasse voltada para cima. Então a casca do ovo ao redor da câmara foi retirada, deixando a membrana externa (branca) exposta. Posteriormente, a membrana da casca do ovo foi removida cuidadosamente com o auxílio de uma pinça, deixando a membrana cório-alantoide exposta. Então, sobre essa membrana foram aplicados 300 µL de cada uma das soluções abaixo:

- a) Solução salina a 0,9% (p/v), utilizada como controle negativo;
- b) Solução de NaOH 1 mol/L, utilizada como controle positivo;
- c) Solução a 1% obtida a partir da umectação completa dos filmes de curcumina.

As membranas cório-alantoides ficaram expostas às respectivas soluções por um período de 20 s e posteriormente lavadas com solução fisiológica e examinadas por 5 min (Figura 28).



**Figura 28.** Desenho esquemático do ensaio de HET-CAM.

Nesse período foram avaliadas a ocorrência de hiperemia, hemorragia, coagulação intravascular (trombose) nos tempos de 30 s, 2 min e 5 min. A observação foi realizada por meio de microscópio acoplado a uma lupa. Por fim, considerando os eventos ocorridos o índice de irritação (II) foi calculado conforme a Equação IX:

$$II = ((301 - HE) \times 5) \div 300 + ((301 - HP) \times 7) \div 300 + ((301 - CO) \times 9) \div 300 \text{ (Equação IX)},$$

onde, II = índice de irritabilidade; HE = tempo para ocorrência de hemorragia (segundos); HP = tempo para ocorrência de hiperemia (segundos); e CO = tempo para ocorrência de coagulação/opacidade (segundos).

A classificação final dos filmes quanto ao seu potencial de irritabilidade do ensaio HET-CAM está descrita na Tabela 3.

**Tabela 3.** Índice para classificação quanto ao grau de irritabilidade.

Índice de irritabilidade	Classificação
0 – 0,9	Não irritante (NI)
1 – 4,9	Irritante Leve (IL)
5 – 8,9	Irritante Moderado (IM)
9 – 21,0	Irritante Severo (IS)

#### 4.12.2 Viabilidade celular

A toxicidade da quitosana foi verificada por meio do ensaio de viabilidade celular (MTT), utilizando a linhagem HaCaT. O cultivo das células foi realizado conforme o item 4.11.1. O ensaio de MTT foi realizado conforme o item 4.11.2 e foram utilizadas as seguintes concentrações de quitosana: 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 12,0 mg/mL. A citotoxicidade foi classificada de acordo com os valores encontrados para viabilidade celular, sendo grave para viabilidade inferior a 30%, moderada para valores entre 30 e 60%, leve para valores entre 60 e 90% ou não citotóxica para valores superiores a 90% (LÖNNROTH, 2005).

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A construção dos cromatogramas foi efetuada com o uso do programa Origin 8. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 6. A análise comparativa foi realizada por ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey. O Teste t de *Student* foi empregado para comparar amostras dependentes e independentes. O nível de significância estatística foi aceito como  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O método analítico desenvolvido teve como foco principal a quantificação de curcumina recuperada das camadas da pele (estrato córneo e pele remanescente) e mucosa oral, uma vez que essa proposta não é contemplada na literatura.

O comprimento de onda na qual a curcumina apresentou absorção máxima da luz UV ocorreu em 424 nm e esse foi o comprimento de onda selecionado para a detecção do fármaco. Os testes iniciais foram realizados a partir de solução de curcumina (padrão e matéria-prima) em etanol (100 µg/mL), e interferentes das camadas da pele e mucosa oral, injetados separadamente. Os ajustes realizados nas condições cromatográficas para obter um pico do fármaco livre de interferentes ou de picos sobrepostos estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Condições cromatográficas testadas no desenvolvimento do método CLAE-UV para quantificação da curcumina.

Teste	Fase Móvel	Proporção da fase móvel (v:v)	Tempo de retenção (min)	Fator de Simetria	Resolução	Pratos teóricos
1		57:43	5,3	1,16	1,73	30040,7
2		55:45	5,4	1,02	1,94	30996,0
3	ACN:TP (pH 3,0)	50:50	6,9	1,12	2,36	23327,5
4		47:53	8,3	1,08	2,64	18549,3
5		43:57	11,5	1,04	2,56	18636,5

Verificou-se que todas as condições testadas foram capazes de separar eficientemente a curcumina dos demais curcuminoides presentes na matéria-prima de curcumina (desmetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina) (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2002; JADHAV; MAHADIK; PARADKAR, 2007). No entanto, em relação aos interferentes das camadas da pele e mucosa, no teste 5 o pico referente ao estrato córneo eluiu no mesmo

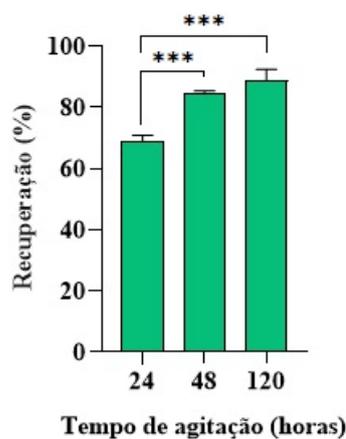
tempo que o pico referente à curcumina e, portanto, essa condição foi descartada.

Avaliando as demais condições testadas, verificou-se que o teste 4 atendia aos parâmetros de adequabilidade, além de apresentar tempo de retenção da curcumina longo o suficiente para a garantir separação dos demais picos dos interferentes (8,3 min). Portanto as condições cromatográficas escolhidas para a validação da metodologia analítica foram:

- Coluna cromatográfica: C<sub>18</sub> de fase reversa de 25 cm × 4,6 mm, 5 μm;
- Vazão da fase móvel: 1,0 mL/min;
- Composição da fase móvel: acetonitrila e ácido fosfórico 1 mmol/L pH 3,0 47:53 (v/v);
- Temperatura do forno: 40 °C; e
- Comprimento de onda de detecção: 424 nm.

## 5.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS FÁRMACOS RETIDOS NAS CAMADAS DA PELE E MUCOSA

Para o estrato córneo, três tempos de extração foram testados (24, 48, 120 h) sob agitação constante (300 rpm), empregando etanol como solvente extrator. A maior recuperação de curcumina foi obtida em 120 h (88,7 ± 3,8%), conforme mostrado na Figura 29. No entanto, como essa taxa de recuperação não foi significativamente diferente da alcançada em 48 h (84,4 ± 1,0%,  $p > 0,05$ ), este menor período de extração foi selecionado para compor o protocolo de extração do ativo.

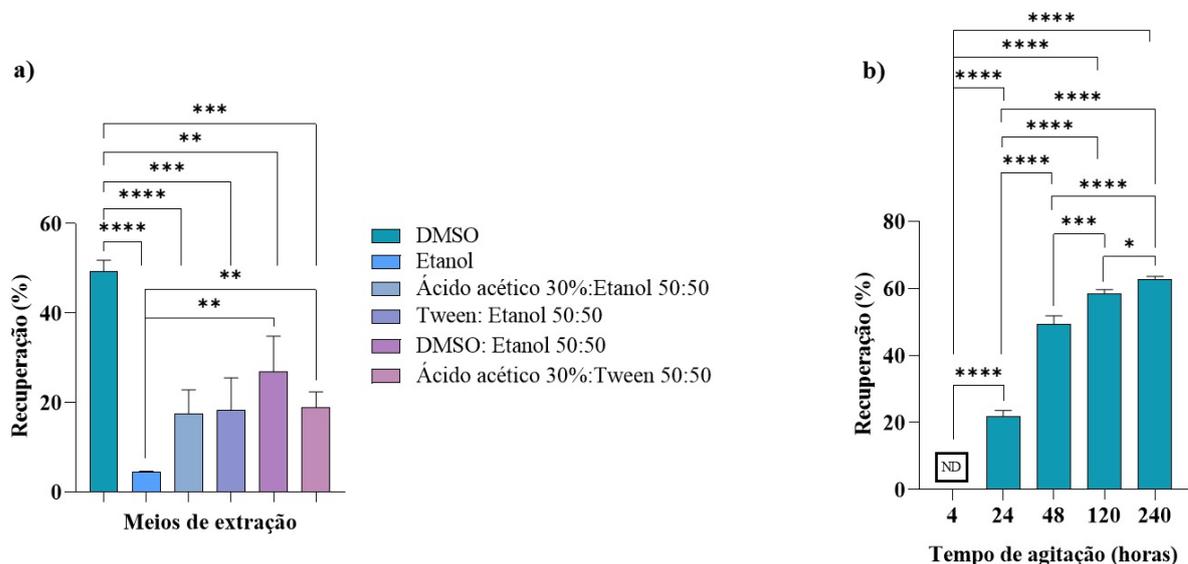


**Figura 29.** A influência dos tempos de extração, sob agitação constante, para a recuperação da curcumina a partir do estrato córneo. Os dados estão representados pela média ± desvio padrão (n = 3). Análise estatística por ANOVA para amostras independentes. (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

Estudos anteriores anteciparam o desafio de extração encontrado particularmente para a fração da pele remanescente devido à forte interação da curcumina com a bicamada lipídica

das membranas (HUNG et al., 2008). De fato, esse fármaco tende a se inserir profundamente na membrana, ancorado por ligações de hidrogênio ao grupo fosfato dos lipídios, semelhante ao colesterol (BARRY et al., 2009). Dessa forma, as primeiras tentativas avaliaram a influência de diferentes solventes na extração da curcumina a partir da pele remanescente. Sob agitação constante (300 rpm) e tempo de extração de 48 h (Figura 30a), o DMSO foi o meio mais adequado para extração da curcumina, com uma taxa de recuperação de  $49,3 \pm 2,6\%$ . Este resultado confirma estudos anteriores que demonstraram alta solubilidade da curcumina em DMSO (ESATBEYOGLU et al., 2012; LESTARI; INDRAYANTO, 2014; KOTHA; LUTHRIA, 2019; JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020), uma vez que se trata de uma molécula anfipática solúvel em solventes polares e apolares (SLABBER; GRIMMER; ROBINSON, 2016). A interação com as camadas bilipídicas pode ser a razão da dificuldade de recuperação do fármaco a partir dessa matriz biológica.

Em seguida, os períodos de extração do fármaco a partir da pele remanescente foram variados em 4, 24, 48, 120 e 240 h, utilizando DMSO como solvente extrator. Ocorreu a maior taxa de recuperação em 240 h ( $62,7 \pm 0,9\%$ ), conforme mostrado na Figura 30b. No entanto, a porcentagem de curcumina foi próxima da conseguida com 120 h de agitação ( $58,5 \pm 1,2\%$ ). Assim, o tempo de 120 h foi escolhido para continuar com a otimização da extração.



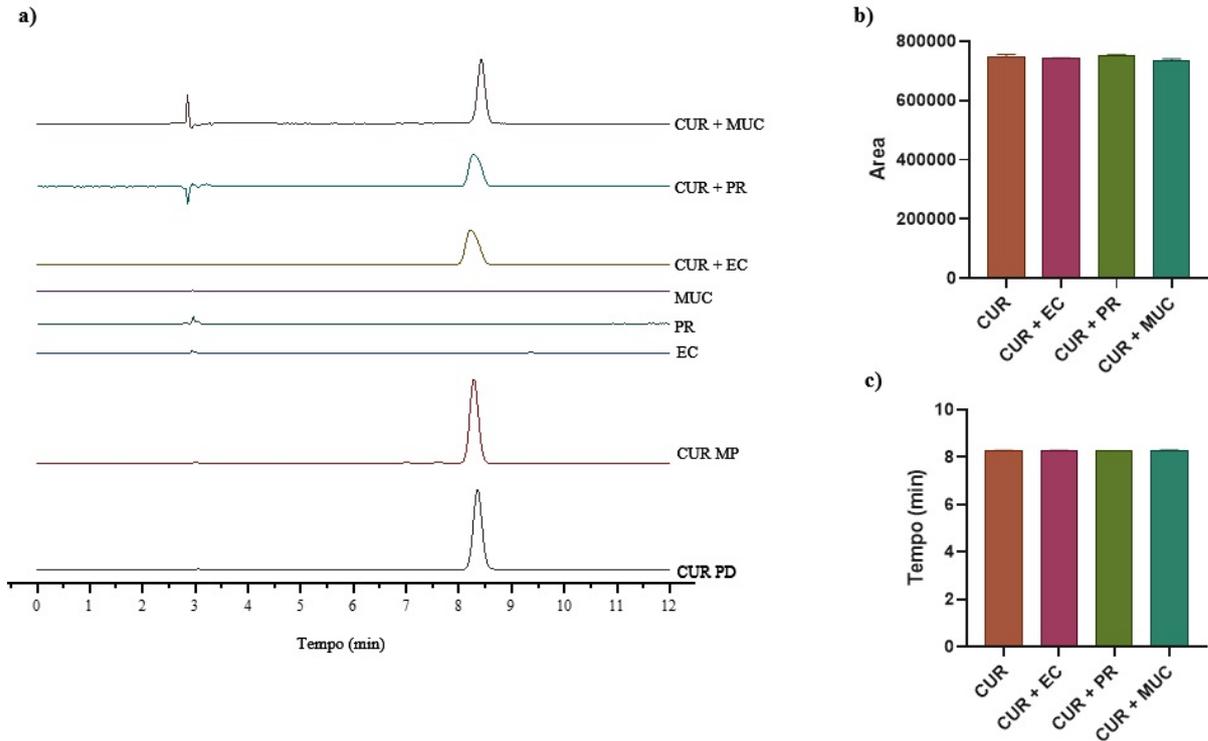
**Figura 30.** Variação dos parâmetros do método de extração da curcumina. (a) influência de diferentes extratores sob condição de agitação constante e tempo de extração para a recuperação da curcumina a partir da pele remanescente. (b) influência dos tempos de extração. Os dados estão representados pela média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). Análise estatística por ANOVA para amostras independentes. (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Finalmente, uma extração adicional foi realizada, substituindo o DMSO da amostra após

120 h da primeira extração por etanol ou DMSO, e deixado sob agitação constante (300 rpm) por mais 48 h. Neste segundo procedimento de extração,  $10,7 \pm 0,4\%$  de curcumina foi recuperada usando etanol e apenas  $6,6 \pm 1,2\%$  usando DMSO. Portanto, o etanol foi selecionado como solvente para a segunda extração, resultando em uma recuperação final de curcumina de  $69,2 \pm 1,6\%$ . A condição descrita foi realizada em triplicata com três concentrações diferentes (2,5, 7,5 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$ ) para garantir a reprodutibilidade do método de extração, o que de fato foi observado. Considerando o difícil equilíbrio de encontrar condições extrativas, que podem recuperar grandes quantidades de fármaco e ao mesmo tempo preservar a capacidade separativa do método analítico, os resultados foram satisfatórios e consistentes com outros métodos de extração de fármaco de matrizes biológicas (CAMPOS; PRAÇA; BENTLEY, 2015; ANGELO et al., 2016; REIS et al., 2018). Para a mucosa, a mesma metodologia de extração utilizada para a pele remanescente foi aplicada com sucesso, resultando em uma recuperação de curcumina igual a  $88,2 \pm 6,3\%$ .

### 5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A seletividade do método analítico foi verificada comparando os cromatogramas obtidos a partir de uma solução de curcumina em etanol e de cada camada de pele e mucosa (Figura 31a). Além disso os gráficos (Figura 31b e 31c) indicaram não haver diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as amostras na ausência e na presença de cada interferente em termos de áreas de pico e tempo de retenção. Portanto, o método foi considerado seletivo na presença dos interferentes dessas matrizes.



**Figura 31.** (a) cromatogramas de CLAE-UV representativos de curcumina (padrão (PD) e matéria-prima (MP)), estrato córneo (EC), pele remanescente (PR) e mucosa oral (MUC) obtidos de acordo com o método estabelecido, com detecção do fármaco em 424 nm. (b) análise em termos de áreas de pico do fármaco isolado e adicionado aos extratos da pele e mucosa. (c) análise em termos de tempo de retenção do fármaco isolado e adicionado aos extratos da pele e mucosa.

Em relação à linearidade, a relação entre a área do pico de curcumina de cada amostra e a respectiva concentração na faixa de 1,0  $\mu\text{g/mL}$  a 30,0  $\mu\text{g/mL}$  foi linear de acordo com o método dos mínimos quadrados. A equação de regressão foi  $y = 99655x - 32033$ , onde  $y$  = área do pico e  $x$  = concentração de curcumina, e o coeficiente de correlação das curvas padrão foi de 0,9996, mostrando uma alta probabilidade de correlação dentro dos limites estabelecidos (ICH, 2005).

A área do pico e os valores de concentração foram proporcionais em uma ampla faixa de concentrações. O coeficiente angular foi diferente de zero, e o alto valor numérico (99655) indicou uma resposta adequada do método mesmo em mudanças de concentração do fármaco. O CV médio dos fatores de resposta foi de 4,7%, dentro do limite aceitável de 5,0% (ICH, 2005).

O LD e LQ calculados foram de 0,2  $\mu\text{g/mL}$  e 0,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Posteriormente foram preparadas soluções de curcumina próximas ao limite de quantificação para confirmação desse valor. Os resultados em termos de precisão e exatidão estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Demonstração experimental do limite de quantificação (LQ) do método cromatográfico para análise de

curcumina.

<b>Concentração teórica (µg/mL)</b>	<b>Concentração experimental (µg/mL)</b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
0,30	0,36	9,98	121,02
0,40	0,41	2,95	101,99
0,50	0,52	1,56	104,86
0,60	0,62	1,15	103,91
0,70	0,72	1,78	102,27
0,80	0,82	1,42	103,06

Considerando os valores adequados para precisão e exatidão (ICH, 2005; ANVISA, 2017), observa-se que o LQ experimental encontrado para a curcumina foi de 0,4 µg/mL, próximo ao calculado teoricamente. Abaixo dessa concentração não se obtiveram valores de precisão e exatidão aceitáveis (menores que  $\pm 5\%$ ). O baixo valor de LQ encontrado deve ser suficiente para quantificar o fármaco recuperado a partir das camadas da pele e mucosa nos ensaios de permeação e penetração cutânea, como será verificado a seguir.

Quanto à precisão, os valores de CV para o estudo de repetibilidade ficaram abaixo de 3,2% (Tabela 6). Para a precisão intermediária, os valores de CV ficaram abaixo de 2,6% e, portanto, abaixo do limite estabelecido de 5,0% (ICH, 2005), mesmo variando analista, dia e equipamento. Esses resultados indicam a consistência da resposta analítica obtida.

**Tabela 6.** Resultados dos testes de precisão para determinação da curcumina. CV = coeficiente de variação.

Concentração teórica (µg/mL)	Alterações no equipamento, dia e analista		Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	CV geral (%)
2,5	Analista 1	Dia 1	2,55	2,75	2,65
	Equipamento 1	Dia 2	2,54	3,30	
	Analista 2	Dia 1	2,58	4,28	
	Equipamento 2	Dia 2	2,30	0,25	
7,5	Analista 1	Dia 1	7,57	2,70	1,74
	Equipamento 1	Dia 2	7,57	2,70	
	Analista 2	Dia 1	7,70	0,72	
	Equipamento 2	Dia 2	6,97	0,86	
30,0	Analista 1	Dia 1	30,25	1,03	1,98
	Equipamento 1	Dia 2	30,25	1,03	
	Analista 2	Dia 1	30,22	2,66	
	Equipamento 2	Dia 2	26,97	3,21	

A exatidão foi expressa como a porcentagem de recuperação de quantidade conhecida do fármaco adicionada a cada matriz biológica analisada. Ela foi avaliada pela quantidade de curcumina recuperada das matrizes biológicas (estrato córneo, pele remanescente e mucosa). O método desenvolvido foi capaz de quantificar uma porcentagem aceitável de curcumina recuperada das matrizes em três concentrações diferentes (2,5, 7,5 e 30,0 µg/mL) da pele e mucosa (BANSAL; DESTEFANO, 2007; DE PAULA et al., 2008), conforme apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7.** Resultados obtidos para recuperação da curcumina a partir do estrato córneo, pele remanescente e mucosa oral, em três concentrações diferentes (2,5, 7,5 e 30,0 µg/mL).

<b>Matriz biológica</b>	<b>Curcumina (µg/mL)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>CV (%)</b>
Estrato córneo	2,5	107,2	2,1
	7,5	95,5	8,6
	30,0	108,9	2,1
Pele remanescente	2,5	76,7	10,2
	7,5	63,5	14,1
	30,0	68,6	3,2
Mucosa oral	2,5	98,1	5,8
	7,5	88,1	3,6
	30,0	82,3	2,4

Para o estrato córneo, a recuperação do fármaco foi superior a 95,5% e 82,3% para a mucosa. Por sua vez, para a pele remanescente, da qual a extração do fármaco exigiu mais esforço, a taxa de recuperação foi superior a 63,5%. Nessa situação, em que a extração é inferior a 70,0%, os pesquisadores podem fazer uso de um fator de correção para os valores, como é comum fazer em casos em que a recuperação é desafiadora (REIS et al., 2018). Portanto, os resultados indicam que o processo de extração considerando as matrizes biológicas testadas é reprodutível, uma vez que o CV de todas as amostras avaliadas está dentro da faixa recomendada para esse tipo de ensaio, ou seja, <15% (BANSAL; DESTEFANO, 2007).

A robustez do método foi avaliada pelas respostas encontradas a partir do desafio de alguns parâmetros, como temperatura do forno, proporção da fase móvel, vazão da fase móvel e pH da fase móvel. Os parâmetros de adequabilidade de sistema permaneceram dentro dos limites aceitáveis, com fator de simetria de  $1,00 \pm 0,00$  a  $1,04 \pm 0,00$ , resolução de  $2,17 \pm 0,02$  a  $3,11 \pm 1,35$ , e pratos teóricos de  $12.463,8 \pm 7,5$  a  $14.125,0 \pm 33,6$ , conforme apresentado na Tabela 8 (ICH, 2005).

**Tabela 8.** Resultados da robustez a partir de desafios em relação a temperatura do forno, proporção da fase móvel, vazão da fase móvel e pH da fase móvel.

Parâmetros	Condição original	Condição testada	Tempo de retenção	Fator de simetria	Resolução	Pratos teóricos
Temperatura do forno	40°C	- 2°C	8,592 ± 0,002	1,02 ± 0,00	3,11 ± 1,35	13070,6 ± 1,6
		Condição original	8,394 ± 0,009	1,04 ± 0,00	2,50 ± 0,02	13834,3 ± 59,4
		+ 2°C	8,235 ± 0,004	1,02 ± 0,00	2,48 ± 0,05	12969,0 ± 82,2
Proporção da fase móvel	acetonitrila : tampão pH 3,0 (47:53)	49:51	7,391 ± 0,001	1,03 ± 0,00	2,17 ± 0,02	12463,8 ± 7,5
		Condição original	8,394 ± 0,009	1,04 ± 0,00	2,50 ± 0,02	13834,3 ± 59,4
		45:55	9,798 ± 0,006	1,00 ± 0,00	2,67 ± 0,04	13262,5 ± 19,4
Vazão da fase móvel	1,0 mL/min	+ 0,1	7,665 ± 0,209	1,01 ± 0,00	2,39 ± 0,03	12600,2 ± 15,9
		Condição original	8,394 ± 0,009	1,04 ± 0,00	2,50 ± 0,02	13834,3 ± 59,4
		- 0,1	9,449 ± 0,002	1,02 ± 0,00	2,53 ± 0,08	14125,0 ± 33,6
pH da fase móvel	3,0	- 0,2	8,359 ± 0,011	1,03 ± 0,00	2,49 ± 0,07	13784,0 ± 68,9
		Condição original	8,394 ± 0,009	1,04 ± 0,00	2,50 ± 0,02	13834,3 ± 59,4
		+ 0,2	8,506 ± 0,219	1,03 ± 0,01	2,51 ± 0,05	14093,7 ± 951,2

O tempo de retenção sofreu pequenas variações quando a condição testada foi proporção entre os solventes da fase móvel, vazão da fase móvel e temperatura do forno. No entanto, essas variações percebidas já eram esperadas, pois mudanças na polaridade ou viscosidade da fase móvel podem aumentar ou diminuir a interação do fármaco com a fase estacionária (SLABBER; GRIMMER; ROBINSON, 2016). Mesmo assim, a resolução do método sempre foi superior a 2,0, garantindo confiabilidade analítica. Em relação à área, a única condição que afetou significativamente a resposta foi a vazão da fase móvel. A área do pico aumentou quando a vazão diminuiu, e o oposto aconteceu quando a vazão aumentou. Portanto, este deve ser um parâmetro controlado ao realizar testes utilizando esta metodologia. Como as respostas às variações não comprometeram o desempenho esperado, verifica-se a confiabilidade do método analítico analisado.

#### 5.4 SOLUBILIDADE DA CURCUMINA

A determinação da solubilidade do fármaco é essencial para a realização de ensaios *in vitro* que envolvam difusão, como os ensaios de liberação e permeação cutânea e em mucosas. A partir dela, é possível avaliar se o experimento será realizado dentro das condições *sink*, garantindo que a difusão do fármaco não fique comprometida pela saturação do meio receptor utilizado (LIU et al., 2013b). Na Tabela 9 estão apresentados valores encontrados de solubilidade para a curcumina nos diferentes meios testados.

**Tabela 9.** Solubilidade da curcumina em diferentes meios. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP; n=3

Meios de solubilização	Solubilidade da curcumina (g/L)
Tampão fosfato pH 6,8	0,002 $\pm$ 0,001
Tampão fosfato pH 5,5	<0,0004
Tampão fosfato pH 5,5 com 0,5% de Tween <sup>®</sup> 80	0,095 $\pm$ 0,000
Tampão fosfato pH 5,5 com 1,0% de Tween <sup>®</sup> 80	0,137 $\pm$ 0,002
Tampão fosfato pH 5,5 com 2,0% de Tween <sup>®</sup> 80	0,245 $\pm$ 0,007
Tampão fosfato pH 5,5 com 3,0% de Tween <sup>®</sup> 80	0,358 $\pm$ 0,016
Tampão fosfato pH 5,5 com 5,0% de Tween <sup>®</sup> 80	0,560 $\pm$ 0,010

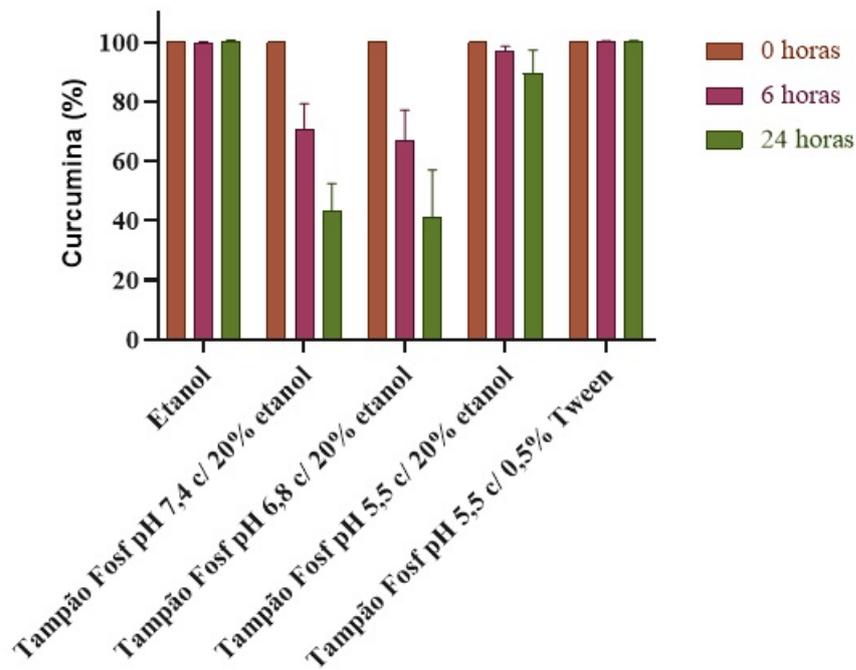
Observou-se uma baixa solubilidade da curcumina em tampão fosfato em diferentes pHs. No entanto, há uma tendência no aumento da solubilidade com o aumento do pH, pois há uma crescente ionização do fármaco à medida que o pH aumenta, já que se trata de fármaco com caráter fracamente ácido (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003; BASNET; SKALKO-BASNET, 2011; ESATBEYOGLU et al., 2012; LESTARI; INDRAYANTO, 2014). Assim, apesar de pH maiores promoverem maior solubilização em relação a pH menores (GALIA E, NICOLAIDES E, HÖRTER D, LÖBENBERG R, REPPAS C, 1998), a curcumina apresenta degradação em pH alcalino (SHEN; JI, 2012; ALINEZHAD et al., 2017) e por esse motivo foi mantido o pH mais baixo (5,5) e adicionadas várias concentrações de um tensoativo não-iônico (Tween<sup>®</sup>80) de forma a aumentar a solubilidade desse fármaco. Como os tensoativos possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, em meio aquoso formam micelas quando atingem concentração micelar crítica (CMC) e aprisionam o fármaco insolúvel em seu núcleo, diminuindo a interação entre a substância hidrofóbica e a água, aumentando a solubilidade do sistema (ERAWATI; ISADIARTUTI; ANGGALIH, 2023).

Verificou-se que as 5 concentrações testadas (0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 5,0%) aumentaram a solubilidade da curcumina de forma significativa ( $p < 0,05$ ) em tampão fosfato pH 5,5. Dessa forma, foi escolhido o tampão com a menor concentração de Tween<sup>®</sup>80 (0,5%) e que ainda mantinha as condições *sink* para realização do ensaio de liberação (tampão fosfato pH 5,5 com 0,5% de Tween<sup>®</sup>80).

Tendo em vista que para o ensaio proposto a massa de fármaco no compartimento doador da célula não excede 139  $\mu\text{g}$ , e que o compartimento receptor é de 15 mL, caso todo o fármaco passasse do compartimento doador para o meio receptor, teríamos uma concentração final de 9,2  $\mu\text{g/mL}$ , o que seria aproximadamente 10 vezes inferior à solubilidade da curcumina nesse meio. Portanto, as condições *sink* são mantidas no meio selecionado.

### 5.5 ESTABILIDADE ANALÍTICA DA CURCUMINA

A avaliação da estabilidade da curcumina nos meios selecionados para estudo é importante para garantir que os resultados analíticos obtidos sejam confiáveis, ou seja, que eles não serão subestimados em consequência da degradação antecipada do ativo. O gráfico apresentado na Figura 32 demonstra a estabilidade da curcumina em diferentes meios por um período de 24 h.



**Figura 32.** Estabilidade da solução de curcumina em diferentes meios, considerando o tempo inicial, 6 h e 24 h após o preparo da solução.

Os dados encontrados demonstram que a curcumina não é estável em algumas condições de pH. O pH 7,4 levou a diminuição do conteúdo de curcumina para  $56,6 \pm 9,0\%$  em relação à solução inicial num período de 24 h. Situação parecida ocorreu em pH 6,8, no qual houve um decaimento para  $59,0 \pm 16,0\%$  do fármaco no mesmo período. Esse decaimento ocorre porque a estabilidade da curcumina em solução aquosa depende do pH, sendo mais estável em pH 1-6, em que sua degradação é muito lenta devido à forma não dissociada dos grupos hidroxila. No entanto, a curcumina é instável em pH maior que 7, sofrendo hidrólise seguida de fragmentação molecular (SHEN; JI, 2012; PRIYADARSINI, 2014). Esses dados explicam a baixa biodisponibilidade da curcumina em pH fisiológico (SHEN; JI, 2012; ALINEZHAD et al., 2017) e impulsiona a necessidade de pesquisas para contornar essa instabilidade.

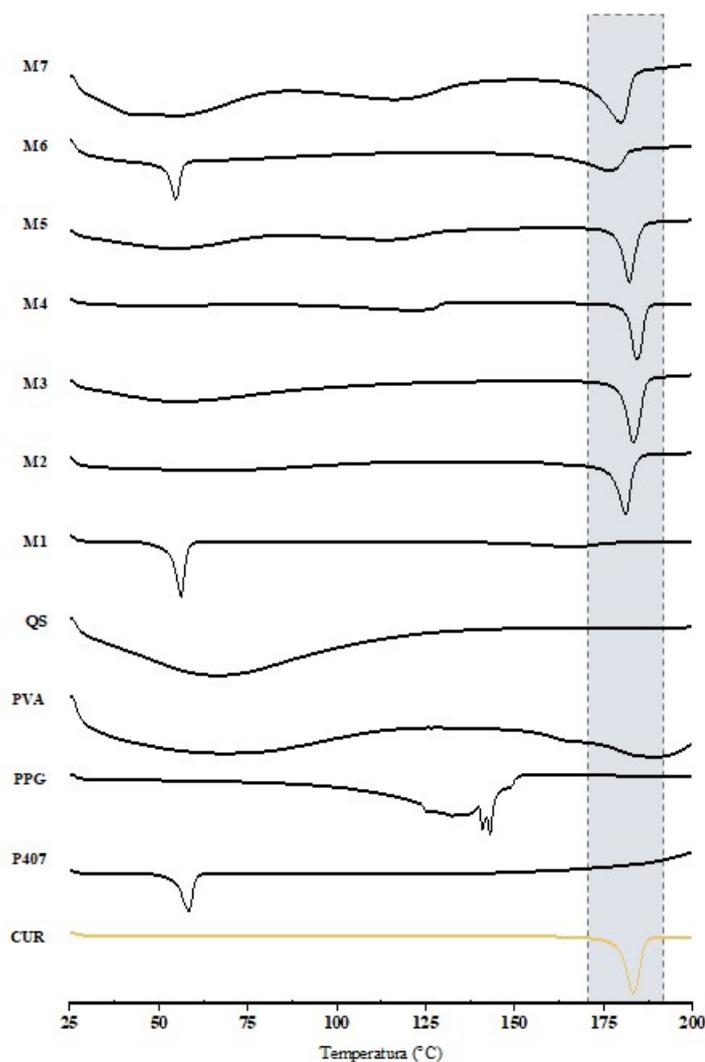
Em etanol e em solução com pH 5,5 não ocorreu degradação significativa, e esse pH foi, portanto, escolhido para ser utilizado no meio receptor dos experimentos de liberação e penetração em pele e mucosa.

## 5.6 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE CURCUMINA E OS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO

O estudo de compatibilidade entre a curcumina e os demais componentes da formulação que deu origem aos filmes é um ponto importante na avaliação da estabilidade do sistema de liberação obtido. Mesmo que esses componentes não tenham atividade terapêutica, eles podem interagir química ou fisicamente com o fármaco, podendo gerar polimorfismo no caso de interações físicas ou degradação no caso de alterações químicas (DANIEL et al., 2021). Essas interações podem ser avaliadas por meio da associação de técnicas como DSC e TG. Para isso, foram feitas análises das substâncias isoladas (curcumina, PVA, Poloxamer<sup>®</sup>407, quitosana e propilenoglicol) e suas misturas físicas (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e M7), conforme descrito na Tabela 1.

A análises por DSC permitem avaliar as variações entálpicas que ocorrem durante um processo de aquecimento, possibilitando obter dados como mudança de estado físico, transição de fase ou reações de desidratação e decomposição. Os perfis referentes à curcumina, aos excipientes e às misturas estão demonstrados na Figura 33. Nela observa-se um evento endotérmico para a curcumina a  $183,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que corresponde ao seu ponto de fusão (AGGARWAL; KUMAR; BHARTI, 2003; BASNET; SKALKO-BASNET, 2011;

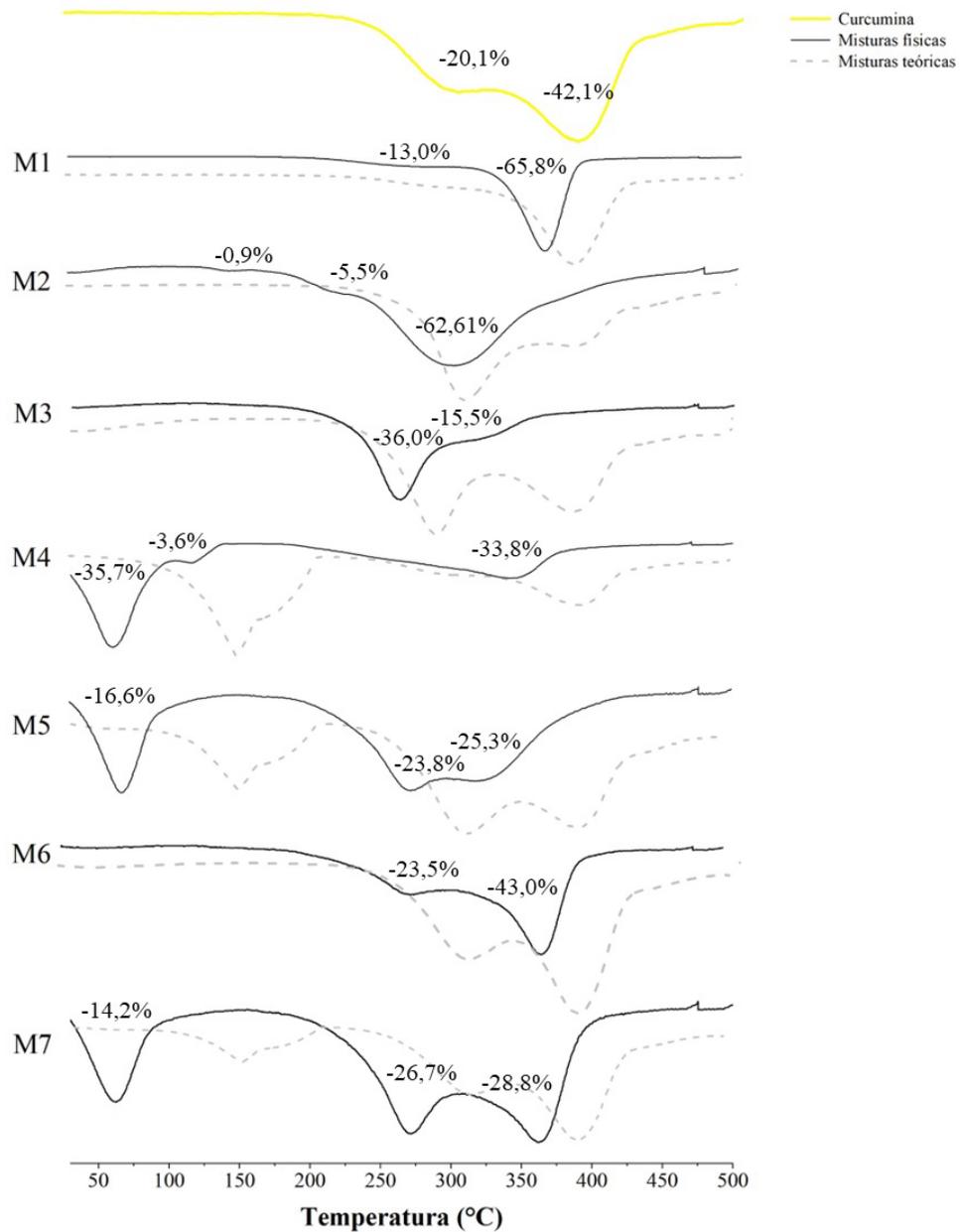
ESATBEYOGLU et al., 2012; LESTARI; INDRAYANTO, 2014). Uma redução drástica deste pico é observada na mistura M1. Tal efeito resulta da capacidade do Poloxamer<sup>®</sup>407 (evento de fusão endotérmica a 56,1 °C) de solubilizar diversos materiais (NEPAL; HAN; CHOI, 2010). Observou-se que o Poloxamer<sup>®</sup>407 possivelmente solubilizou quase completamente a curcumina na mistura binária M1. De fato, tal efeito também é observado em outras misturas onde o Poloxamer<sup>®</sup>407 é utilizado (M6 e M7). Esse comportamento é desejável para promover a máxima interação do fármaco com o veículo do filme, mantendo-o no estado amorfo. Os demais excipientes, por sua vez, mostraram-se inertes ao fármaco, ou seja, as misturas M2, M3, M4 e M5 não apresentaram alterações significativas em seus perfis térmicos esperados.



**Figura 33.** Análises de DSC da curcumina, demais componentes dos filmes isolados e suas misturas físicas. Taxa de aquecimento 10 °C/min de 25 a 200 °C sob amostra controlada de nitrogênio. Onde CUR: curcumina, P407: Poloxamer<sup>®</sup>407, PPG: propilenoglicol, PVA: álcool polivinílico, QS: quitosana.

Quanto às análises de TGA, foi possível identificar os eventos de decomposição de cada

componente e suas misturas. A Figura 34 apresenta as curvas experimentalmente obtidas por meio do uso da primeira derivada das curvas de perda de massa fornecidas pela TGA (DrTGA). Nela também estão apresentados os perfis teóricos das misturas (linhas tracejadas) obtidos pela soma dos picos dos compostos individuais considerando sua proporção em cada mistura.



**Figura 34.** Primeira derivada de análises termogravimétricas (DrTGA) de curcumina e mistura física dos componentes dos filmes (M1 a M7) e perfil teórico obtido dos compostos individuais. Cada evento de perda de massa é indicado na forma de porcentagem (%).

Observa-se que a curcumina sofreu decomposição em duas etapas: a primeira na faixa de 223 – 327 °C com perda de massa de 20,1%, e a segunda na faixa de 327 – 483 °C com perda de massa de 42,1%. A ocorrência de decomposição dos excipientes isolados está descrita na Tabela 10.

**Tabela 10.** Demonstração da perda de massa (%) dos componentes isolados da formulação e a respectiva faixa de temperatura da ocorrência do evento.

Excipiente	Perda de massa (%)	Faixa de Temperatura (°C)
Poloxamer <sup>®</sup> 407	-96,7%	292 – 434
Álcool polivinílico	-78,6%	199 – 409
Quitossana	-42,9%	222 – 379
Propilenoglicol	-100,3%	30 – 211

Nas misturas binárias droga-excipiente M1, M2 e M3, os eventos esperados de perda de massa associados à decomposição da amostra foram antecipados. Porém, esses eventos permaneceram acima de 200 °C, sugerindo que a estabilidade da amostra foi mantida em temperaturas inferiores a esta.

No caso das misturas contendo propilenoglicol (M4, M5 e M7), foi observada uma antecipação da evaporação desse excipiente, que começou a ocorrer por volta de 100 °C, possivelmente devido à sua interação com o fármaco e outros materiais. Tal ocorrência é esperada e não afeta a estabilidade da amostra, cuja decomposição ocorre acima de 200 °C.

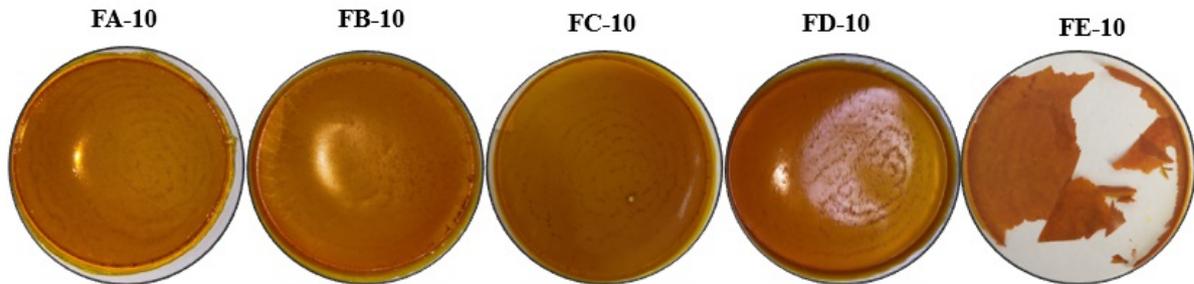
No caso particular da mistura M7, que contém todos os componentes propostos para o filme juntos, o perfil de perda de massa, embora antecipado, preservou o perfil teórico esperado, indicando a manutenção das reações químicas dos componentes isolados, reforçando assim a compatibilidade entre materiais.

## 5.7 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES CONTENDO CURCUMINA

Foram testadas cinco formulações contendo curcumina como opção de filmes destinados ao tratamento tópico de câncer de boca e pele. Os filmes foram produzidos com diferentes polímeros e diversas concentrações de curcumina (31,5; 78,6; e 157,3 µg/cm<sup>2</sup>). Eles passaram por uma inspeção visual prévia para avaliar os parâmetros mínimos de qualidade estabelecidos para essa forma farmacêutica (filme homogêneo, flexível e livre de rachaduras). Em um segundo momento, aqueles que apresentaram os melhores resultados, foram caracterizados.

Inicialmente foram produzidos filmes com uma concentração maior de curcumina incorporada (157,3 µg/cm<sup>2</sup>). No entanto, foram observados diversos pontos correspondentes a fármaco precipitado em todas as formulações testadas, conforme apresentado na Figura 35. Isso

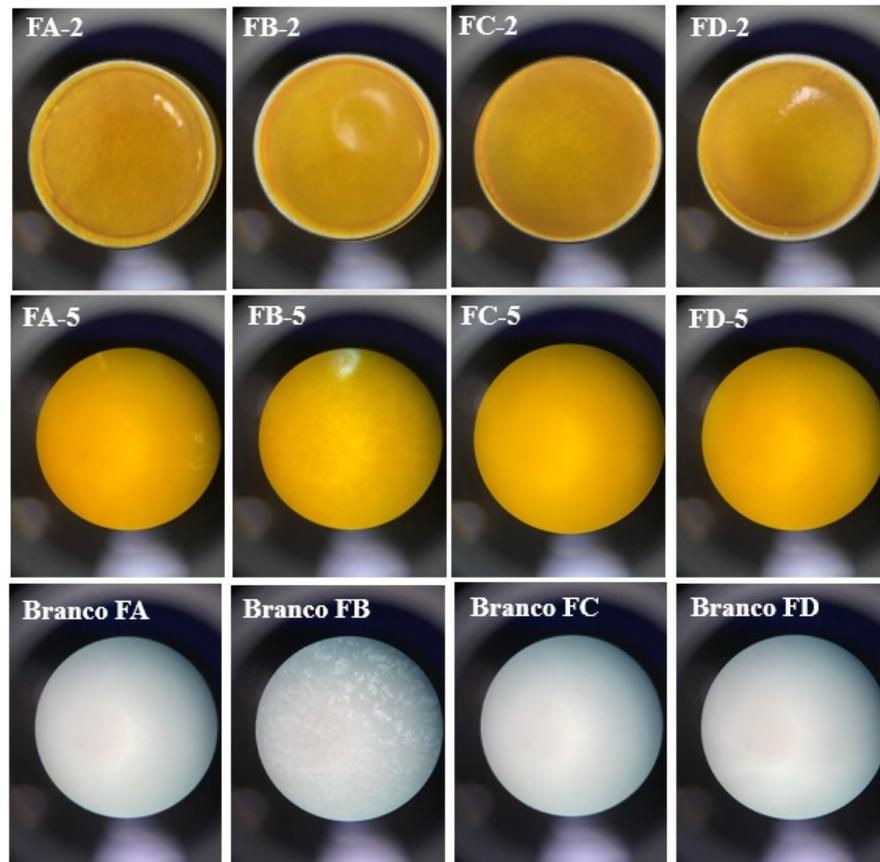
ocorre devido à característica lipofílica da curcumina ( $\log P = 3,29$ ) (LESTARI; INDRAYANTO, 2014; JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020), mesmo na presença do Poloxamer<sup>®</sup>407, que é um polímero que possui característica anfifílica (FONSECA-GARCÍA; JIMÉNEZ-REGALADO; AGUIRRE-LOREDO, 2021).



**Figura 35.** Filmes de curcumina produzidos pela técnica de evaporação do solvente a uma concentração de  $157,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Onde FA-10: CUR + QS + PPG + PVA; FB-10: CUR + P407 + PPG + PVA; FC-10: CUR + QS + P407 + PVA; FD-10: CUR + QS + P407 + PPG + PVA; FE-10: CUR + QS + P407 + PPG.

Além disso, os resultados mostram que a ausência de PVA na formulação FE inviabilizou a formação de filme, mesmo na presença dos demais polímeros. A quitosana e o Poloxamer<sup>®</sup>407, que também são polímeros formadores de filmes, não sustentaram a estrutura porque usualmente se faz necessária uma concentração maior desses polímeros para formação de filmes consistentes (GU; ALEXANDRIDIS, 2004; FONSECA-GARCÍA; JIMÉNEZ-REGALADO; AGUIRRE-LOREDO, 2021). Portanto, a formulação FE foi descartada para os demais testes.

Posteriormente foram avaliados os filmes produzidos a partir de menores concentrações de curcumina ( $31,5$  e  $78,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), além dos filmes sem o fármaco (Figura 36). A avaliação prévia desses filmes permitiu verificar que a formulação foi capaz de incorporar a concentração aplicada de curcumina, formando filmes lisos, flexíveis, livres de bolhas ou precipitados, exceto para os filmes FB-2 e FB-5 (que não continham quitosana). Em relação aos filmes produzidos sem o fármaco, um deles também apresentou precipitado (branco FB). Isso ocorreu provavelmente porque a quitosana (ausente nas formulações FB) interage com os demais polímeros, formando blenda polimérica e melhorando as características gerais dos filmes. Essas blendas ocorrem na junção de dois ou mais polímeros no intuito de melhoria de suas características, como acontece entre a quitosana e o PVA (KANATT et al., 2012).



**Figura 36.** Filmes de curcumina produzidos pela técnica de evaporação do solvente a uma concentração de  $31,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (FA-2, FB-2, FC-2 e FD-2) e  $78,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (FA-5, FC-5 e FD-5), além de filmes produzidos sem o fármaco (branco FA, branco FB, branco FC e branco FD).

Dessa forma, considerando os resultados obtidos, optou-se por dar prosseguimento à caracterização dos filmes que incorporaram uma maior quantidade de fármaco,  $78,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (FA-5, FC-5 e FD-5), e ainda mantiveram as características mínimas para essa forma farmacêutica. Portanto, as formulações FA-2, FB-2, FC-2 e FD-2 foram descartadas, juntamente com a formulação FB-5, que apresentou curcumina precipitada em sua estrutura.

Os filmes produzidos foram alaranjados, lisos, sem a presença de grumos, precipitados ou rachaduras, conforme já apresentado na Figura 36. Os resultados quanto ao peso, espessura, pH, resistência à dobradura e teor de curcumina estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Caracterização dos filmes de quitosana produzidos a partir da técnica de evaporação de solvente contendo 78,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de curcumina.

Filme	Peso (g)	Espessura (mm)	pH	Resistência à dobradura	Teor ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
FA-5	2,364 $\pm$ 0,065	0,25 $\pm$ 0,01	5,5 $\pm$ 0,1	> 300	75,3 $\pm$ 3,2
FC-5	2,202 $\pm$ 0,031	0,21 $\pm$ 0,01	5,3 $\pm$ 0,0	> 300	79,3 $\pm$ 4,2
FD-5	2,767 $\pm$ 0,043	0,23 $\pm$ 0,01	5,2 $\pm$ 0,1	> 300	80,4 $\pm$ 6,2

Quanto ao peso e espessura, os resultados foram homogêneos dentro de cada formulação, demonstrando que a técnica de preparação utilizada permitiu um controle da massa e da espessura dos filmes. A homogeneidade do peso e espessura do filme está relacionada à uniformidade de dose e outras características como a bioadesão (NAIR et al., 2013). Ressalta-se que uma variação muito grande nesse parâmetro poderia influenciar nas propriedades físico-químicas e mecânicas do filme (VECCHI et al., 2021). Além disso, a espessura ficou dentro da ideal para filmes orais, relatada ser entre 0,05 e 1,00 mm (NAIR et al., 2013).

Quanto ao pH, ele precisa ser compatível com o tolerado pela pele e mucosa oral para não causar efeitos colaterais ao paciente. Necessita também ser compatível com o fármaco, já que a curcumina é sensível a pHs mais básicos (SHEN; JI, 2012). Os resultados de pH das formulações estão dentro da faixa de pH tolerada para a cavidade oral (ABOUHUSSEIN et al., 2020) e pele (GREENMAN, 1981), ou seja, entre 5,2 e 5,3. Além disso, a variação do pH da formulação pode afetar o grau de ionização da própria molécula de curcumina, tornando-a mais ou menos ionizada. No pH em torno de 5,0, a maior parte da curcumina encontra-se na sua forma não ionizada, o que favorece a permeação do fármaco, já que facilita a sua partição para o estrato córneo da pele, por exemplo (ÖHMAN; VAHLQUIST, 1998; GELFUSO et al., 2015). Quanto à resistência à dobradura, todos os filmes resistiram às 300 dobraduras sem quebrar, o que demonstra a sua flexibilidade, facilitando a aplicação mesmo em locais de administração onde a pele se dobra (NAIR et al., 2013). O conteúdo de curcumina manteve-se uniforme nas três formulações avaliadas, com resultados bem próximos à concentração adicionada do fármaco no filme, que foi igual a 78,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

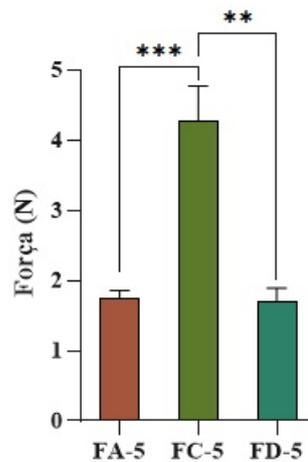
O índice de intumescimento de um filme colabora com a sua força mucoadesiva, pois a hidratação do polímero leva ao relaxamento e à interpenetração das cadeias poliméricas, aumentando a interação com o tecido biológico (NAIR et al., 2013; KHAN et al., 2016). Além disso, o grau de inchaço desses filmes é um parâmetro importante para a liberação do fármaco a partir da plataforma polimérica, cedendo ou aprisionando o fármaco dentro da estrutura (KHAN et al., 2016).

A Tabela 12 mostra a evolução do ganho de massa em relação à massa inicial de cada filme no decorrer do tempo. Observa-se que o filme FA-5 apresenta um menor ganho de massa em relação aos demais (FC-5 e FD-5). Isso ocorre provavelmente por causa da adição de Poloxamer<sup>®</sup>407 a essas duas formulações, pois estudos com esse acréscimo a sistemas contendo PVA ou PVP mostraram que a porção mais hidrofílica desse componente altera a propriedade de intumescimento da matriz (VECCHI et al., 2021).

**Tabela 12.** Perfil de intumescimento dos filmes de curcumina na presença de água.

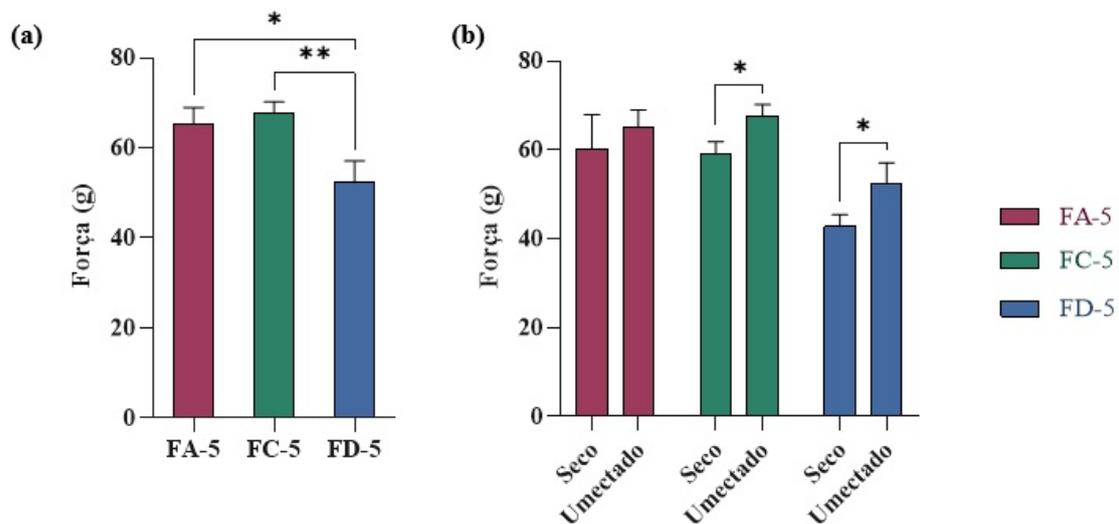
Filmes	Índice de intumescimento (%)				
	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
FA-5	62,6 ± 7,5	85,8 ± 12,9	164,2 ± 13,3	233,4 ± 19,0	384,6 ± 59,0
FC-5	75,4 ± 5,7	128,8 ± 14,5	226,6 ± 18,7	333,3 ± 23,4	522,3 ± 32,5
FD-5	91,8 ± 7,2	138,5 ± 10,2	240,9 ± 17,3	381,2 ± 38,1	641,7 ± 25,0

A força de ruptura é medida pela resistência oferecida pelo material no ponto de ruptura. De acordo com os resultados apresentados na Figura 37, observa-se uma maior resistência a ruptura no filme FC-5 em relação aos demais (FA-5 e FC-5), possivelmente devido à presença de plastificante (propilenoglicol), uma vez que ele causa um desarranjo da rede polimérica, dando maior flexibilidade ao material com conseqüente redução da resistência à tração (GARCIA; PINOTTI; ZARITZKY, 2006; LIU et al., 2013a).



**Figura 37.** Representação gráfica dos resultados de força de ruptura, realizados por meio de texturômetro. Os dados estão representados pela média ± desvio padrão (n = 3). Análise estatística por ANOVA para amostras independentes. (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

A mucoadesividade avalia o grau de ligação do filme à mucosa, sendo um parâmetro fundamental no desenvolvimento de filmes bioadesivos e impactando diretamente na liberação do ativo para o tecido alvo. A mucoadesividade adequada permite um longo tempo de permanência da forma farmacêutica em contato com a mucosa, bem como resiste ao fluxo de saliva e ao movimento da cavidade, no caso de aplicação oral. A avaliação desse parâmetro foi realizada verificando-se a força máxima necessária para separar o filme de um disco de mucina hidratado (Figura 38).



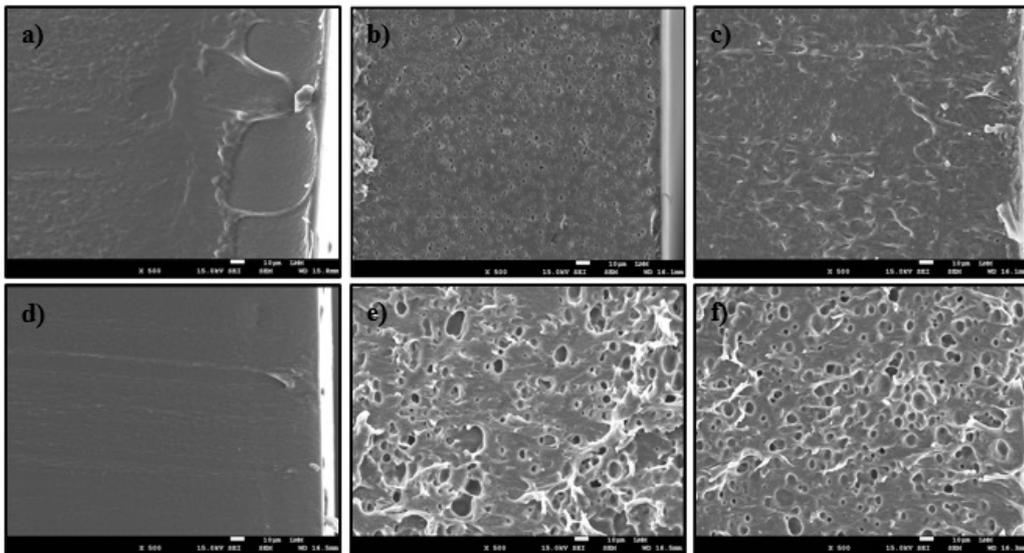
**Figura 38.** Representação gráfica dos resultados de mucoadesividade, realizados por meio de texturômetro. (a) comparativo da mucoadesividade entre os filmes previamente umectados. (b) comparativo da mucoadesividade entre filmes secos e umectados a partir das mesmas formulações. Os dados estão representados pela média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). Análise estatística por ANOVA para amostras independentes. (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

De acordo com a literatura, o estudo mostrou que o grau de mucoadesão dos filmes provavelmente atenderá ao tempo de permanência necessário para a liberação do fármaco. Vários fatores podem contribuir para essa mucoadesividade, e um deles é a característica dos polímeros envolvidos, o que inclui grupos funcionais disponíveis para interação com a mucosa. Um desses polímeros é o PVA, que forma ligações de hidrogênio com as glicoproteínas da mucina a partir de seus grupos hidroxila (VECCHI et al., 2021). Outro é a quitosana, cuja carga positiva favorece a adesão à carga negativa da mucina presente no muco (SMART, 2005). Além disso, a quitosana empregada foi a de médio peso molecular (190-310 KDa), cujas dimensões das cadeias são ideais para que a mucoadesão ocorra; que foi relatado ser de 104 Da a cerca de 4106 Da (SMART, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). De fato, polímeros de maior peso molecular não se hidratam imediatamente de modo que possibilitem a interação

com os tecidos, enquanto os polímeros de baixo peso molecular formam géis rapidamente e se dissolvem com mais facilidade (SMART, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

O grau de hidratação também afeta a mucoadesividade. Nesse caso, observa-se uma maior mucoadesividade nos filmes que passaram pela umectação anteriormente ao teste. Essa hidratação auxilia a expandir a cadeia polimérica, aumentando a exposição dos grupos funcionais e ainda facilitando a interpenetração das cadeias poliméricas (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CHAUHAN et al., 2018). No entanto, uma hidratação excessiva pode levar à formação de uma mucilagem escorregadia, que leva à diminuição da mucoadesão. Isso corrobora com os dados obtidos a partir da avaliação do intumescimento dos filmes, no qual o filme FD-5 apresentou um maior intumescimento, principalmente em relação FA-5, e uma menor mucoadesividade.

Por fim, a morfologia dos filmes também foi avaliada. A Figura 39 apresenta ampliação de 500 vezes do corte transversal dos filmes contendo ou não a curcumina incorporada.



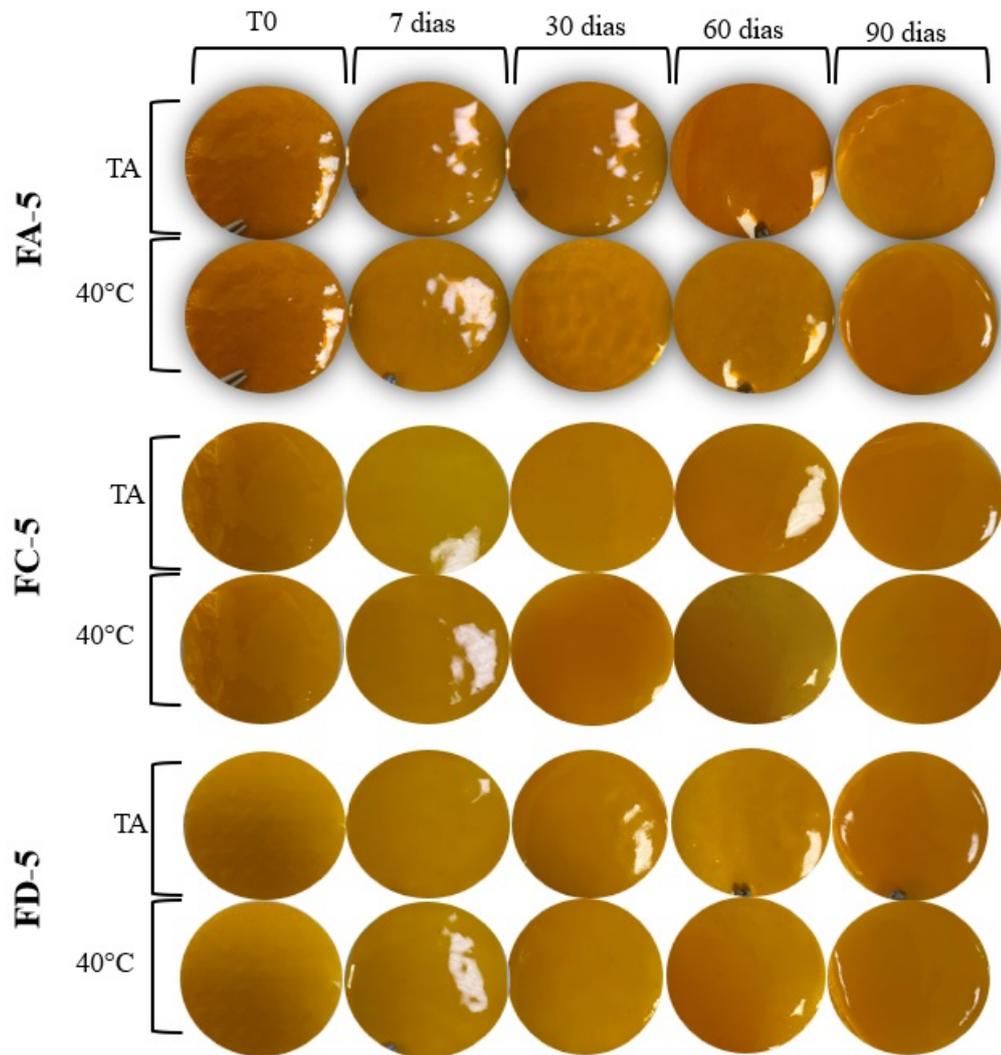
**Figura 39.** Microscopia eletrônica de varredura dos filmes, em corte transversal. (a) filme FA-5 contendo o fármaco, (b) filme FC-5 contendo o fármaco, (c) filme FD-5 contendo o fármaco, (d) filme FA-5 sem o fármaco, filme FC-5 sem o fármaco e (f) filme FD-5 sem o fármaco. Aumento das imagens: 5000 ×.

Nas imagens é possível visualizar claramente a diferença entre os filmes que contêm o Poloxamer<sup>®</sup>407 (FC-5 e FD-5) em relação ao que não possui (FA-5). Nesse corte é possível visualizar estruturas esponjosas nos filmes que contêm o Poloxamer<sup>®</sup>407. A formação dessa estrutura pode ocorrer devido às interações e arranjos das partes hidrofóbicas e hidrofílicas desse polímero anfifílico. Esse dado reforça a explicação para um maior intumescimento dos filmes que possuem Poloxamer<sup>®</sup>407, pois além de criar uma estrutura menos compacta, as regiões hidrofílicas podem auxiliar no aumento desse intumescimento. Já a diferença entre as amostras que contêm ou não o fármaco, pode estar relacionada a interação do fármaco lipofílico

com as regiões lipofílicas do Poloxamer<sup>®</sup>407, tendo em vista que essa diferença somente é observada dos filmes que contém esse excipiente.

## 5.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS FILMES

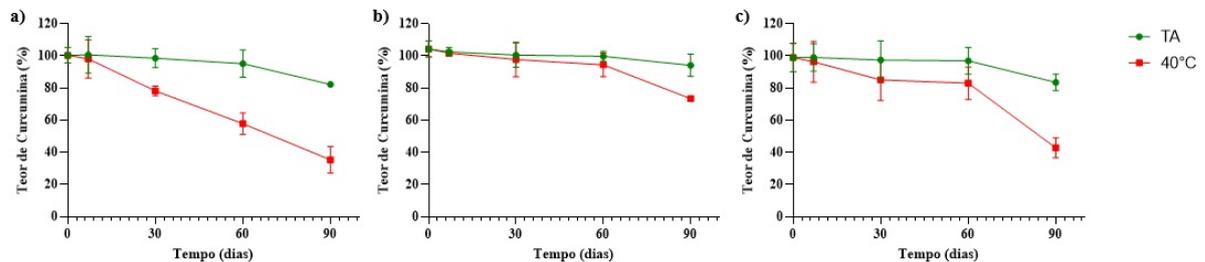
Aspectos relacionados à formulação, como forma farmacêutica, processo de fabricação e propriedades físico-químicas de seus componentes influenciam a estabilidade de uma formulação, bem como fatores ambientais como umidade, luminosidade e temperatura (GIBSON, 2001). O estudo de estabilidade dos filmes contendo curcumina foi realizado em duas condições de armazenamento, temperatura ambiente e  $40 \pm 3$  °C, nos dias 0 (logo após o preparo), 7, 30, 60 e 90. Esse estudo teve como base a avaliação de aspectos como aparência, peso, espessura, pH e teor de curcumina a partir dos filmes submetidos às duas temperaturas nos tempos especificados. Os resultados referentes ao aspecto foram apresentados na Figura 40, os resultados referentes ao peso, espessura e pH foram expressos na Tabela 13, e os resultados referentes ao teor de curcumina estão demonstrados na Figura 41.



**Figura 40.** Imagens capturadas dos filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) em cada um dos tempos predefinidos para o estudo de estabilidade (0, 7, 30, 60 e 90 dias), para as duas condições de armazenamento (temperatura ambiente e 40 °C).

**Tabela 13.** Resultados de estabilidade referentes aos testes de peso, espessura e pH dos filmes FA-5, FC-5 e FD-5, nos tempos de 0, 7, 30, 60 e 90 dias em temperatura ambiente e 40° C. Resultados representados por triplicata  $\pm$  DP.

Tempo	Condição	Peso (mg)			Espessura (mm)			pH		
		FA-5	FC-5	FD-5	FA-5	FC-5	FD-5	FA-5	FC-5	FD-5
Dia 0	TA	2384,0 $\pm$ 49,6	2167,5 $\pm$ 35,2	2790,2 $\pm$ 84,8	0,32 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03	5,5 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,2
	40°C	2361,3 $\pm$ 18,2	2137,2 $\pm$ 22,6	2799,0 $\pm$ 84,3	0,33 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,04	5,5 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,2
7 dias	TA	2383,8 $\pm$ 84,8	2167,3 $\pm$ 49,9	2790,0 $\pm$ 35,3	0,31 $\pm$ 0,07	0,25 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,04	5,5 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 0,1
	40°C	2360,1 $\pm$ 18,2	2136,7 $\pm$ 22,6	2798,6 $\pm$ 84,3	0,33 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,03	5,4 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1
30 dias	TA	2383,4 $\pm$ 84,4	2167,3 $\pm$ 49,5	2789,5 $\pm$ 35,9	0,33 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,04	5,5 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1
	40°C	2357,7 $\pm$ 18,7	2135,6 $\pm$ 22,1	2796,9 $\pm$ 83,8	0,33 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,04	5,3 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,2
60 dias	TA	2383,2 $\pm$ 84,5	2166,8 $\pm$ 49,3	2786,1 $\pm$ 36,0	0,33 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,04	5,4 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1
	40°C	2354,8 $\pm$ 20,8	2134,9 $\pm$ 22,6	2796,0 $\pm$ 83,9	0,32 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,04	5,4 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,1
90 dias	TA	2383,0 $\pm$ 87,5	2165,5 $\pm$ 49,9	2783,7 $\pm$ 36,9	0,31 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,04	5,4 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,0	5,3 $\pm$ 0,1
	40°C	2352,8 $\pm$ 20,8	2133,8 $\pm$ 22,8	2794,9 $\pm$ 84,4	0,30 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,07	0,36 $\pm$ 0,05	5,5 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,2



**Figura 41.** Variação de teor de curcumina dos filmes FA-5 (a), FC-5 (b) e FD-5 (c) em temperatura ambiente e 40° C. Os dados representam média de 3 determinações  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes em comparação a análise inicial de cada condição ( $p \leq 0,05$ ).

Conforme mostrado na Figura 40, observou-se que durante os 90 dias de duração do estudo não houve alterações na aparência dos filmes. Todos permaneceram livres de rachaduras, bolhas, precipitados, sem sinais de alteração de cor ou consistência independente da formulação avaliada. Em relação ao peso, espessura e pH, não houve alterações significativas ( $p > 0,05$ ) desses parâmetros no decorrer do estudo. Esses resultados indicam estabilidade física da formulação por pelo menos 90 dias.

Quanto ao teor de curcumina (Figura 41) em temperatura ambiente, somente o filme FA-5 apresentou degradação significativa ( $p > 0,05$ ) ao final dos 90 dias, chegando a uma

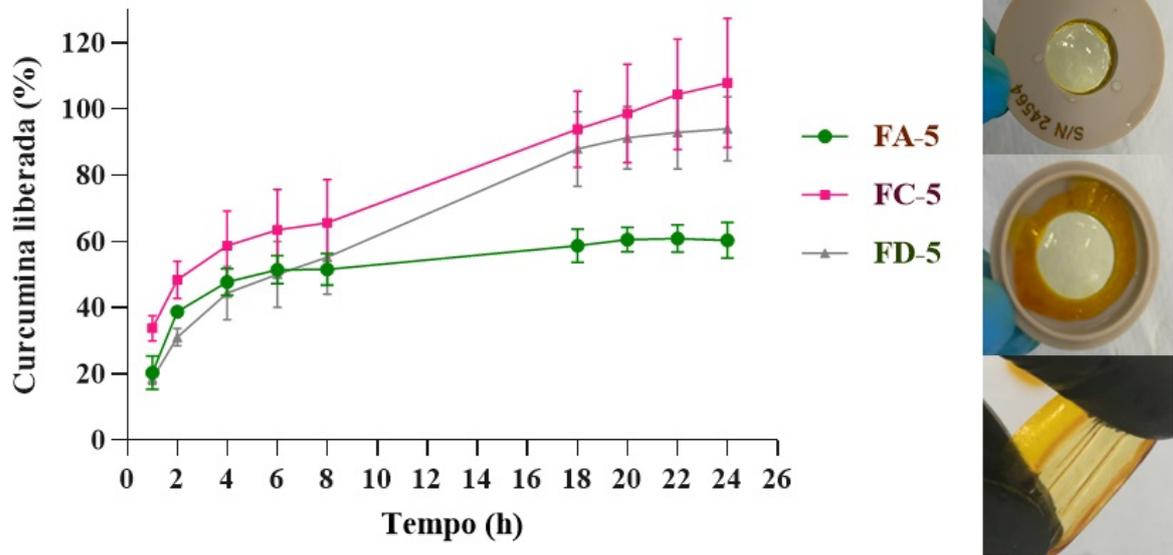
degradação de 16,7%, no tempo de 90 dias em relação ao teor inicial. Os demais tempos não apresentaram degradação significativa. O teor de fármaco nos filmes FC-5 e FD-5 permaneceu estável durante o período do estudo.

Quanto às formulações armazenadas a 40° C, observou-se uma maior degradação do fármaco em relação ao armazenamento a temperatura ambiente. O Filme FA-5 apresentou degradação significativa a partir de 30 dias, em que a degradação foi de 22,0%. No tempo de 60 dias a degradação foi de 42,3% e no tempo de 90 dias a degradação foi de 64,8%. Para o filme FC-5, a degradação de curcumina somente foi significativa no tempo de 90 dias, em que a degradação chegou a 29,5%. O mesmo aconteceu para o filme FD-5, com degradação de 56,8% aos 90 dias de experimento. Essa maior degradação dos filmes FA-5 e FD-5 em uma temperatura de 40 °C pode estar relacionada à presença do propilenoglicol nessas formulações, pois além de exercer função de plastificante (GARCIA; PINOTTI; ZARITZKY, 2006; LIU et al., 2013a), esse adjuvante farmacotécnico possui característica higroscópica, funcionando como umectante na formulação (CATANZARO; GRAHAM SMITH, 1991). Portanto, considerando a vulnerabilidade da cadeia da curcumina a hidrólise, com formação de ácido ferúlico e feruloilmetano e vanilina (TØNNESEN; KARLSEN, 1985; WANG et al., 1997; LESTARI; INDRAYANTO, 2014), a pequena quantidade de água absorvida pelo propilenoglicol pode ter acelerado o processo de degradação das curcumina nessas formulações. Por outro lado, no filme em que o propilenoglicol não esteve presente, a degradação do ativo ocorreu somente no tempo de 90 dias e em uma proporção menor do que os demais filmes.

Assim, apesar dos filmes apresentarem degradação do ativo a uma condição extrapolada de temperatura a partir de 90 dias, o que mostra que a temperatura é um fator que compromete a estabilidade química da curcumina nos filmes, os filmes foram considerados estáveis em temperatura ambiente por um período de 90 dias para os filmes FC-5 e FD-5 e 60 dias para o filme FA-5. Ressalta-se que a adição de preservantes, como antioxidantes, poderá ampliar a estabilidade das formulações, tornando-as industrialmente atrativas.

## 5.9 ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO DE CURCUMINA A PARTIR DOS FILMES

O estudo de liberação foi realizado *in vitro* e teve como objetivo avaliar a velocidade com que o fármaco é liberado dos três filmes analisados. O perfil de liberação da curcumina a partir dos filmes FA-5, FC-5 e FD-5 foram comparados entre si. Os perfis de liberação estão apresentados na Figura 42. Nela também está demonstrada a integridade dos filmes ao final das 24 h de duração do ensaio.



**Figura 42.** Perfil de liberação da curcumina a partir dos filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) no período de 24 h, com coletas em 1, 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 e 24 h e registro fotográfico dos filmes ao final do ensaio. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes em comparação para cada ponto de coleta ( $p < 0,05$ ).

A formulação FA-5 liberou a curcumina de maneira sustentada, chegando ao final das 24 h com uma liberação de aproximadamente 60% do fármaco. Já os filmes FC-5 e FD-5 liberaram acima de 94% do fármaco ao final das 24 h de duração do experimento. Um dos prováveis motivos para esse comportamento está relacionado ao grau de intumescimento dos filmes, uma vez que os filmes FC-5 e FD-5 apresentaram um maior intumescimento em relação ao filme FA-5. O intumescimento é um parâmetro importante para liberação de fármacos, pois o excesso de inchaço pode afrouxar a rede polimérica e acelerar a liberação do fármaco (KHAN et al., 2016).

O perfil de liberação das formulações FC-5 e FD-5 foi estatisticamente igual ( $p < 0,05$ ) a partir de 6 h de experimento. Essa diferença aumenta quando comparados à formulação FA-5, a partir de 18 h de experimento, quando a formulação FA-5 demonstrou aprisionamento do fármaco em sua rede polimérica.

Em relação à cinética de liberação, os valores de regressão linear ( $r^2$ ) obtidos para a aplicação dos modelos matemáticos em cada um dos perfis de liberação estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Valores de regressão linear ( $r^2$ ) obtidos pela aplicação dos perfis de liberação nos modelos de ordem zero, Higuchi, primeira ordem, Weibull e Hixson Crowell.

Filme	Regressão linear ( $r^2$ )				
	Ordem zero	Higuchi	Primeira ordem	Weibull	Hixson-Crowell
FA-5	0,3387	0,5679	0,3933	0,7343	0,6610
FC-5	0,5988	0,8212	0,6190	0,9438	0,8835
FD-5	0,5328	0,7717	0,6404	0,9200	0,8434

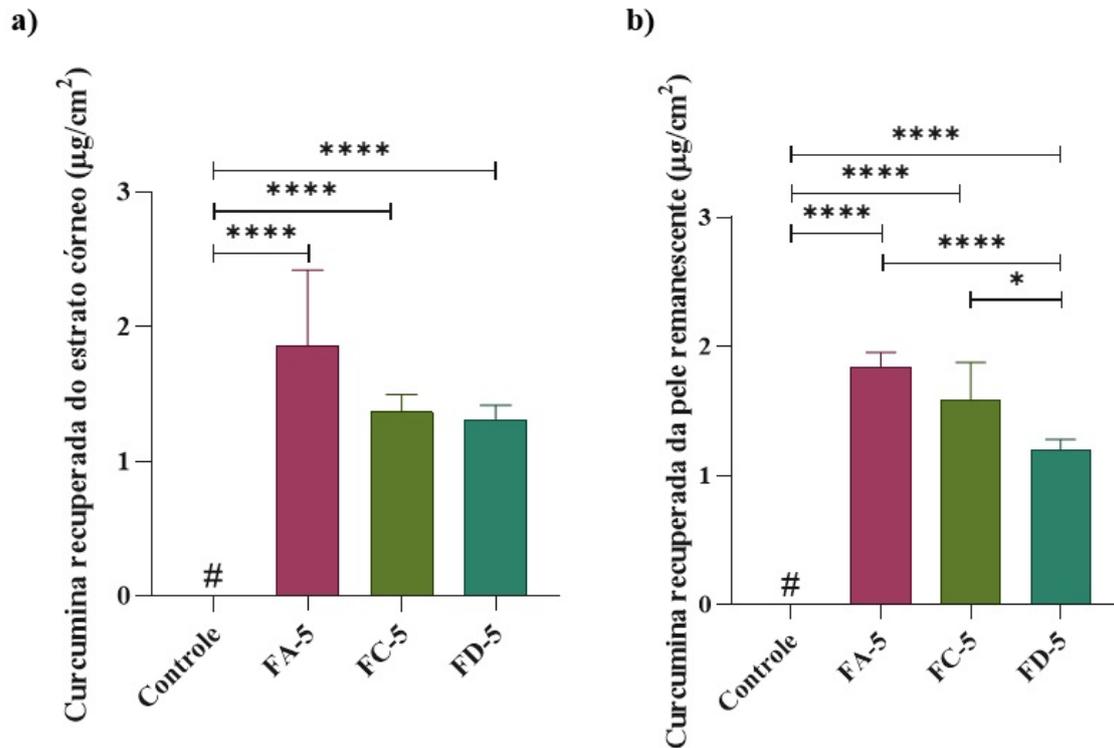
Verificou-se que o perfil cinético de liberação do fármaco a partir de todos os filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) seguiu o modelo de *Weibull*, uma vez que os coeficientes de correlação linear ficaram mais próximos de 1,0 para todas as formulações. De fato, esse modelo normalmente representa a liberação de substâncias incorporadas a matrizes poliméricas, com uma liberação lenta (PAPADOPOULOU et al., 2006; LIU et al., 2020).

### 5.10 ENSAIOS *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO

Os ensaios *in vitro* de permeação permitem prever possíveis mecanismos de transporte de fármaco através dos tecidos que compõem pele e mucosa, permitindo a otimização de formulações tópicas (NAIR et al., 2013). Esse tipo de estudo foi conduzido para verificar a permeação do fármaco para as camadas da pele, por meio da quantificação da curcumina a partir do meio receptor, e a capacidade de penetração da curcumina na mucosa bucal e pele. No caso da pele, diferenciou-se a quantidade de fármaco retido em sua camada mais superficial, o estrato córneo, das camadas mais profundas que compreendem epiderme viável e derme (pele remanescente).

Inicialmente, ensaios de permeação estática foram realizados utilizando células de difusão vertical do tipo *Franz*, tanto para a pele, quanto para a mucosa.

Na Figura 43 estão demonstrados os dados referentes à distribuição do fármaco nas camadas da pele (estrato córneo e pele remanescente) a partir dos filmes e da curcumina livre por meio da permeação estática.

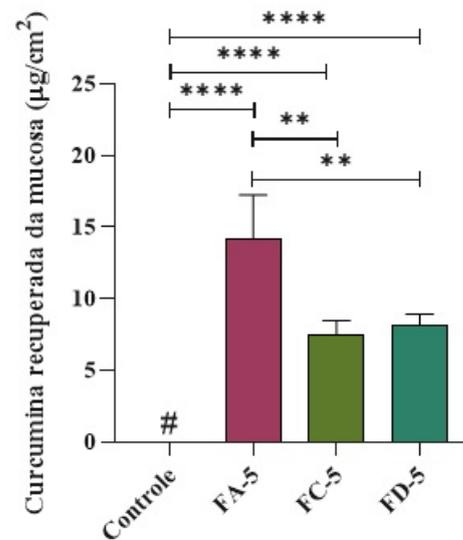


**Figura 43.** Curcumina recuperada da pele ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) após 24 h de permeação estática dos filmes em comparação ao controle. (a) Estrato córneo, (b) pele remanescente. Os dados representam média de 5 determinações  $\pm$  desvio padrão. # = valores abaixo de limite de quantificação. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Em relação ao estrato córneo, observa-se que as formulações FA-5, FC-5 e FD-5 promoveram a penetração de curcumina em quantidade acima do limite de quantificação assegurado pela validação analítica. A retenção de ativo nessa camada da pele foi de  $1,9 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o filme FA-5, de  $1,4 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o filme FC-5 e de  $1,3 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o filme FD-5. Nota-se que não há diferença estatística entre as formulações testadas. No entanto, há diferença entre as formulações e o controle, tendo em vista que o controle não promoveu a penetração de curcumina em concentrações acima do limite de quantificação do método. Situação semelhante ocorreu para a pele remanescente, em que a solução controle também não atingiu o limite de quantificação. A penetração de curcumina nessa camada foi de  $2,7 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o filme FA-5, de  $2,3 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o filme FC-5 e de  $1,7 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o filme FD-5, com diferença estatística entre os filmes FA-5 e FC-5 em relação ao FD-5.

Ressalta-se ainda que a quantificação da curcumina no meio receptor também ficou abaixo do limite de quantificação em relação a todas as amostras, da mesma forma que aconteceu em relação ao fármaco livre. Isso indica que a permeação do fármaco através da pele é restrita, o que é desejado para um tratamento tópico e não sistêmico.

Em relação à penetração da curcumina na mucosa após aplicação do filme, os dados estão apresentados na Figura 44.



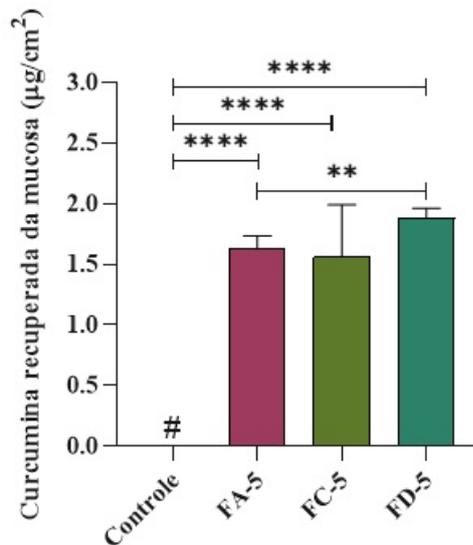
**Figura 44.** Curcumina recuperada da mucosa ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) após 24 h de permeação estática dos filmes em comparação ao controle. Os dados representam média de 5 determinações  $\pm$  desvio padrão. # = abaixo de limite de quantificação. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

A quantificação da curcumina no meio receptor ficou abaixo do limite de quantificação em relação a todas as amostras e, também, em relação ao fármaco em solução. Quanto aos tecidos analisados, apesar do fármaco em solução não penetrar em quantidade acima do limite de quantificação, os filmes proporcionaram uma penetração consistente da curcumina na mucosa. Observa-se que o filme FA-5 possibilitou uma penetração de curcumina na mucosa 2 vezes maior em relação ao filme FC-5 ( $7,5 \pm 1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) e 1,7 vezes maior em relação ao filme FD-5 ( $8,2 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), chegando a uma concentração de fármaco penetrado de  $14,2 \pm 3,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Os resultados demonstram que os filmes preparados são bons sistemas de liberação para auxiliar no transporte de curcumina até o seu local de ação. A carga positiva da quitosana interage eletrostaticamente com a superfície da mucosa, carregada negativamente, aumentando a adesão do filme à cavidade oral. Além disso, esse tecido é bastante hidratado, diferente da pele, o que possibilita o aumento da adesão do filme ao tecido (KUMAR; VIMAL; KUMAR, 2016).

A presença de Poloxamer<sup>®</sup>407, polímero anfifílico presente nas formulações FC-5 e FD-5, pode ter contribuído para a formação de micelas com caráter hidrofóbico em seu interior aprisionando o fármaco, também apolar e assim dificultando a entrega da curcumina aos tecidos propostos. No entanto, de forma geral, considerando a estrutura de proteção da pele, já era esperada uma maior dificuldade de penetração do fármaco nesse tecido.

Em relação ao ensaio dinâmico para a mucosa, o teste foi realizado para avaliar o comportamento dos filmes em condições mais próximas à condição real de aplicação, em situação que simule a drenagem da formulação pela saliva (MATOS et al., 2020). A Figura 45 apresenta a quantidade de curcumina recuperada da mucosa oral ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) após 12 h de tratamento com os filmes.



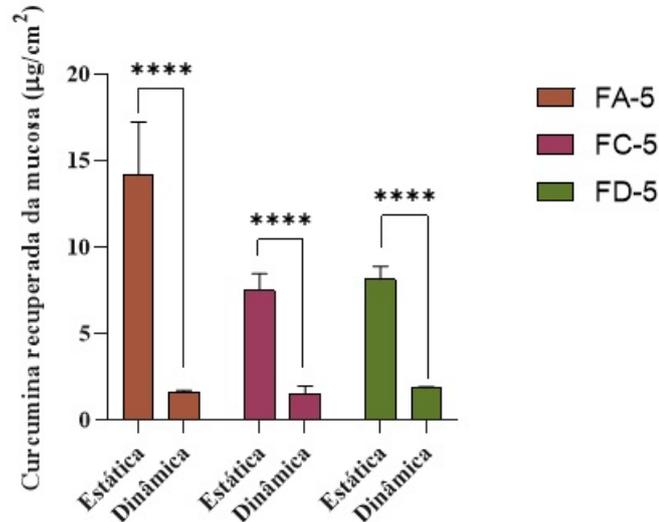
**Figura 45.** Curcumina recuperada da mucosa ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) após 12 h de permeação dinâmica em comparação ao controle. Os dados representam média de 5 determinações  $\pm$  desvio padrão. # = abaixo de limite de quantificação. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Inicialmente observou-se que os filmes se mantiveram aderidos à mucosa após 12 horas de aplicação, mesmo com sucessivas aplicações de fluído que simularam a produção de saliva na cavidade bucal, o que reforça a significativa mucoadesividade dos filmes. De acordo com os dados apresentados, verifica-se que as formulações FA-5, FC-5 e FD-5 promoveram uma penetração consistente de curcumina, diferente do que aconteceu com o fármaco em solução, que não pode ser sequer quantificado.

Nota-se uma diminuição da quantidade que penetrou a mucosa em relação à permeação estática (Figura 46), chegando a  $1,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o filme FA-5 (8,9 vezes menor do que o ensaio estático),  $1,6 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o filme FC-5 (4,7 vezes menor do que o ensaio estático) e  $1,9 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para o filme FD-5 (4,3 vezes menor do que o ensaio estático). Essa redução era esperada, uma vez que o sistema de liberação foi desafiado com um fluxo de solvente simulando a salivação. Dessa forma, houve a diluição do fármaco liberado do filme pela saliva simulada (PBS) (ABRUZZO et al., 2012).

Cabe ressaltar que considerando que a área da mucosa bucal é de aproximadamente  $50 \text{ cm}^2$  (SHOJAEI, 1998; WOODLEY, 2001b) e que o volume de saliva produzido estimulado

pela salivacão é aproximadamente 25 mL a cada 15 min (MADSEN et al., 2013), o volume de saliva simulada aplicada foi suficiente para representar as condições reais de aplicação dos filmes na mucosa oral.



**Figura 46.** Comparação da quantidade de curcumina recuperada após aplicação de protocolo estático e dinâmico à mucosa suína. Os dados representam média de 5 determinações  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Na permeação estática o filme FA-5, mesmo possuindo uma menor taxa de liberação em relação aos demais filmes (FC-5 e FD-5), conseguiu uma maior penetração do fármaco na mucosa. Isso pode ter ocorrido porque a permeação estática não ocorre num ambiente favorável ao intumescimento, diferente do que ocorre no ensaio dinâmico, no qual ocorre aplicação periódica de fluido que proporciona o intumescimento dos filmes e consequente afrouxamento da rede polimérica possibilitando a liberação do fármaco (KHAN et al., 2016).

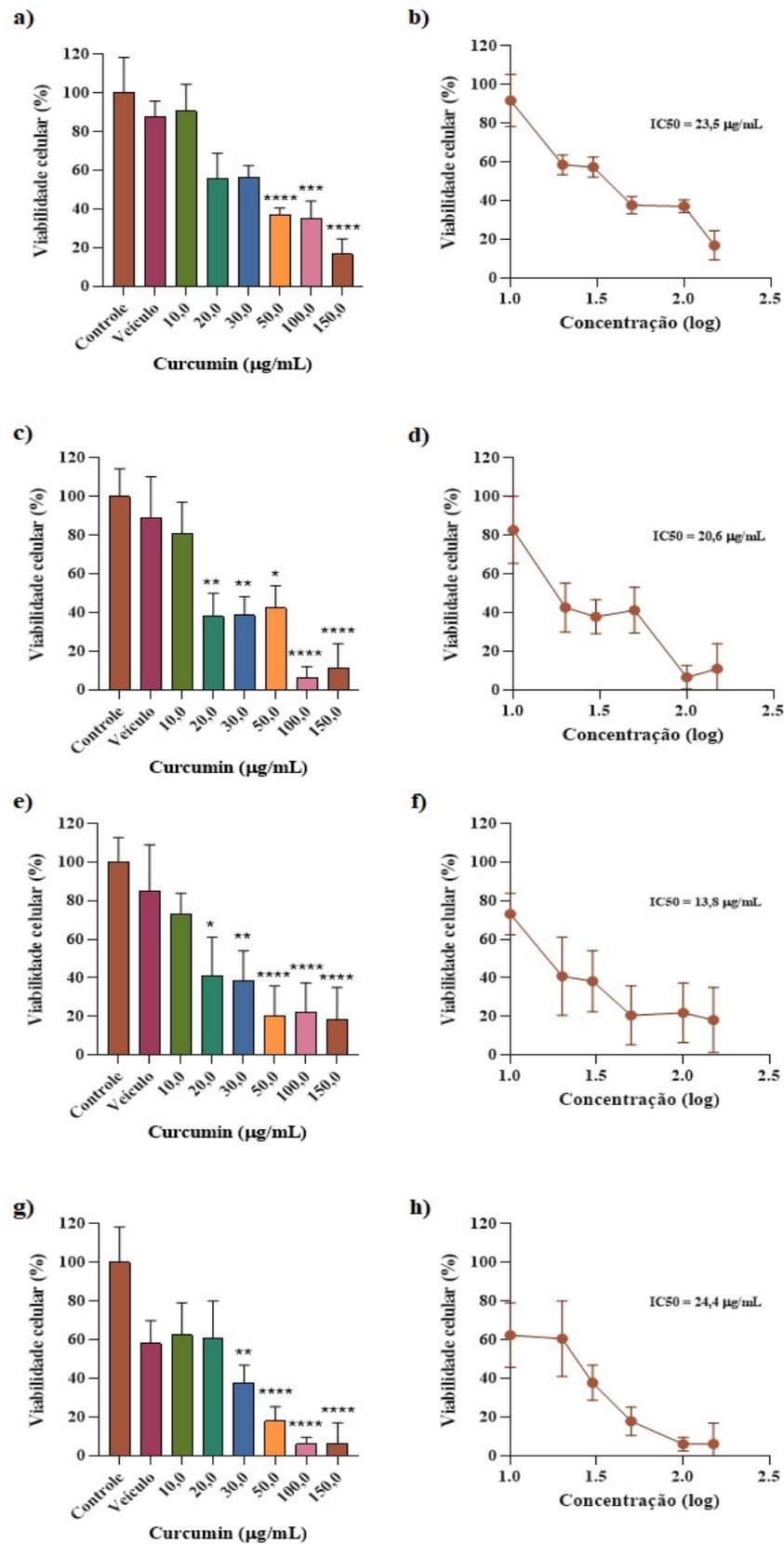
Esses resultados demonstram que os filmes preparados são sistemas de liberação promissores para auxiliar no transporte de curcumina até o seu local de ação. A carga positiva da quitosana interage eletrostaticamente com a superfície da mucosa, carregada negativamente, incluindo ácido siálico, bem como superfícies epiteliais, aumentando a adesão do filme à cavidade oral. Além disso, a quitosana promove a despolimerização da F-actina e dissolução da proteína ZO-1 das junções de oclusão, favorecendo sua abertura, e promovendo maior entrega do fármaco a esses tecidos (VLLASALIU et al., 2010; WAYS; LAU; KHUTORYANSKIY, 2018; MATOS et al., 2020) Além disso, como a mucosa é um tecido bastante hidratado há uma expectativa de melhor adesão e penetração dos filmes (KUMAR; VIMAL; KUMAR, 2016), pois a quitosana possui a capacidade de desidratar parcialmente a superfície da mucosa onde está em contato e criar uma forte adesividade, diferente do que acontece com a pele, devido a sua estrutura organizada com função protetiva e menos hidratada (STIE et al., 2020).

Outro ponto relevante a ser observado é a dificuldade da curcumina em permear tecidos. Isso se deve à forte interação da curcumina com as membranas lipídicas das células, por conta do forte caráter lipídico desse fármaco (HUNG et al., 2008; BARRY et al., 2009). Nessas condições, verifica-se a importância da escolha apropriada da forma farmacêutica considerando as características físico-químicas do fármaco que será utilizado. Neste caso, os filmes disponibilizam o fármaco por um longo período diretamente no local de ação e ainda possibilitam a incorporação de agentes que auxiliam nessa interação.

Por fim, como a proposta desse trabalho foi uma distribuição local nesse fármaco, verificou-se por meio dos ensaios *in vitro* de viabilidade celular que a curcumina conseguiu penetrar nos tecidos em quantidade suficiente para induzir a efetividade do fármaco no tratamento de tumores cutâneos e orais.

#### 5.11 VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de MTT foi utilizado para avaliação da viabilidade de diferentes culturas celulares tratadas com diferentes concentrações de curcumina (10,0 - 150,0 µg/mL) para definirem-se curvas dose-resposta. Essa avaliação foi realizada em três tipos de células tumorais (FaDu, SCC-9 e MeWo) e células saudáveis (queratinócitos - HaCaT). Os resultados referentes a curva dose-resposta estão apresentados na Figura 47.



**Figura 47.** Efeito da curcumina na viabilidade das linhagens celulares HaCaT, FaDu, SCC-9 e MeWo. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para os dados de viabilidade celular e também a IC<sub>50</sub> foram calculados após a regressão não linear nas curvas dose-resposta. Os dados estão representados pela média ± desvio padrão (n = 9). (a) e (b) referem-se à linhagem HaCaT, (c) e (d) referem-se à linhagem FaDu, (e) e (f) referem-se à linhagem SCC-9 e (g) e (h) referem-se a linhagem MeWo.

É possível observar uma diminuição da viabilidade celular nas concentrações mais baixas da curva para as células tumorais (FaDu, SCC-9 e MeWo), demonstrando diferença estatística a partir da concentração de 20,0 µg/mL para FaDu, SCC-9 e HaCaT e 30,0 µg/mL para a MeWo em relação ao controle. Em relação ao queratinócito (HaCaT) foi necessária uma maior concentração de curcumina para diminuição da viabilidade celular, demonstrando diferença estatística a partir da concentração de 50,0 µg/mL em relação ao mesmo veículo. Observa-se ainda que a curcumina induziu um efeito dose-dependente nas quatro linhagens celulares. Ressalta-se que as células tumorais (FaDu e SCC-9) responderam numa concentração mais baixa em relação aos queratinócitos, o que sugere uma maior sensibilidade das células tumorais em comparação com células sadias.

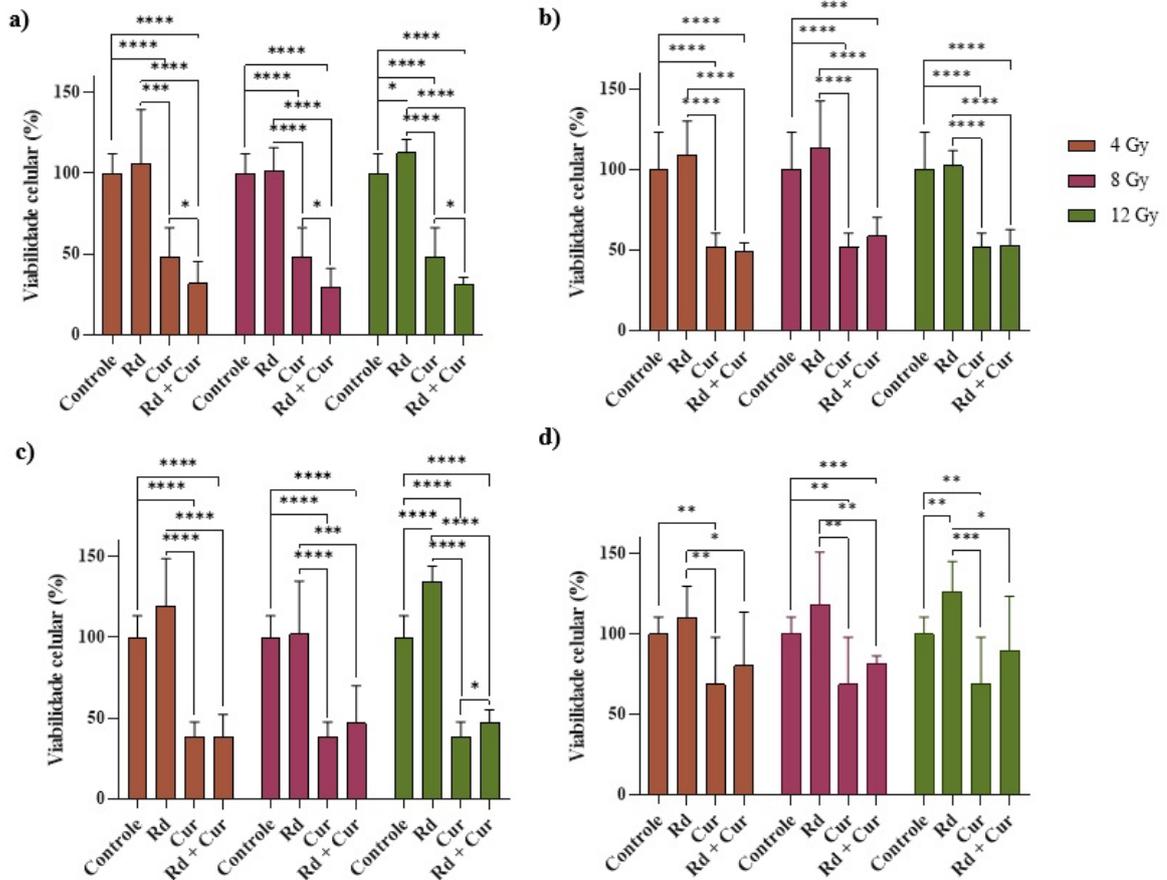
A curva dose-resposta obtida foi utilizada para calcular a IC<sub>50</sub> para cada uma das linhagens celulares, que corresponde à dose necessária para induzir 50% de citotoxicidade. Nessa avaliação, a linhagem FaDu obteve uma IC<sub>50</sub> de 20,6 µg/mL, a linhagem SCC-9 de 13,8 µg/mL, a linhagem MeWo de 24,4 µg/mL e a linhagem HaCaT de 23,5 µg/mL. Esses valores foram utilizados para calcular o índice de seletividade tumoral da curcumina (HORII et al., 2012), sendo de 1,14 para a linhagem FaDu, 1,70 para a linhagem SCC-9 e 0,96 para a linhagem MeWo. Os valores encontrados reforçam a seletividade da curcumina pelas células tumorais. Além disso, verifica-se que os valores encontrados para a IC<sub>50</sub> das células tumorais são próximos daqueles encontrados nos ensaios de permeação dinâmica realizado em mucosa e permeação estática realizada na pele, considerando que o volume aplicado em cada poço foi de 100 µL da solução estoque, o que indica que os filmes desenvolvidos são capazes de fornecer para os tecidos concentrações efetivas de curcumina.

A ação da curcumina nas células tumorais pode estar associada à interrupção do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M, indução à micronucleação e multinucleação, que são aberrações nucleares consideradas sinais de genotoxicidade associados à apoptose, perturbação à organização do citoesqueleto, impedindo a progressão da célula ao longo do ciclo celular e regulação do PI3K – AKT – da via de sinalização mTOR, modificando a expressão de genes e proteínas chave (BORGES et al., 2020).

A interrupção do ciclo celular está associada ao estresse celular, que pode ser causa das falhas no processo de reparo do DNA e levar à morte da célula, inibindo a evolução da interfase para a mitose (BORGES et al., 2020; DESHPANDE et al., 2023). Quanto ao citoesqueleto, estudo demonstrou que a curcumina interrompe a organização do citoesqueleto das linhagens FaDu e SCC-9, resultando em distribuição difusa e granular da actina na primeira linhagem e disposições periféricas, com aspecto granular e concentrado, na segunda. Essas alterações são

visualizadas morfológicamente por meio de arredondamento e achatamento das células, bem como micronucleação e multinucleação (BORGES et al., 2020). Ainda nesse estudo, em relação a expressão de proteínas-chave para a sinalização PIK3 – AKT – mTOR, foi verificado que a curcumina diminuiu os níveis de mTOR, que é um regulador central de muitos processos celulares como metabolismo da glicose, síntese de nucleotídeos, autofagia, proliferação celular, rearranjo do citoesqueleto, migração celular, homeostase metabólica, síntese de proteínas e lipídios, biogênese mitocondrial, biogênese e apoptose. Frequentemente há uma hiperatividade desse fator na maioria dos cânceres, envolvendo fatores relacionados à sobrevivência celular, rearranjo do citoesqueleto, invasão, metástase, anti-apoptose e inibição da autofagia (MURUGAN, 2019; BORGES et al., 2020).

Verificou-se então a citotoxicidade *in vitro* da curcumina por meio da avaliação da viabilidade celular na presença ou não de radiação ionizante. O valor de IC<sub>50</sub> foi determinado para cada uma das linhagens celulares após 24 h de tratamento com curcumina, sendo igual a 23,5 µg/mL para a HaCaT, 20,6 µg/mL para a FaDu, 13,8 µg/mL para a SCC-9 e 24,4 µg/mL para a MeWo. Foram aplicadas três dosagens de radioterapia (4, 8 e 12 Gy) a cada uma das linhagens celulares, contendo ou não o tratamento com curcumina, além do controle, sem radiação, contendo ou não o tratamento com curcumina. Os resultados estão apresentados na Figura 48.



**Figura 48.** Efeito da curcumina na viabilidade das linhagens celulares HaCaT (a), FaDu (b), SCC-9 (c) e MeWo (d) associada ou não a 3 doses diferentes de radioterapia. Os dados estão representados pela média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 9$ ). Análise estatística por Teste t Student para amostras independentes (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$

Observa-se que não houve diminuição da viabilidade celular após 24 h da aplicação de radioterapia em dose única (4, 8 ou 12 Gy) para nenhuma das linhagens. Quanto ao tratamento somente com curcumina, verifica-se que houve diminuição da viabilidade celular em todas as linhagens analisadas em relação ao tratamento com radioterapia isolada e em relação ao controle. Quanto ao tratamento com curcumina associada à radioterapia em dose única (4, 8 ou 12 Gy), houve diminuição da viabilidade celular em todas as linhagens celulares quando comparadas à radioterapia isolada, sob as mesmas dosagens, ou ao controle, exceto para a linhagem MeWo nas dosagens de 4 e 12 Gy, em que não houve diferença estatística em relação ao controle.

No entanto, quando o tratamento com curcumina associado à radioterapia foi comparado à terapia com curcumina isolada observa-se que não há um efeito sinérgico para as células tumorais, exceto para a linhagem SCC-9 com a dosagem de 12 Gy, em que a viabilidade do tratamento somente com curcumina foi até maior. Já para a linhagem não tumoral (HaCaT) houve uma diminuição da viabilidade celular a partir da aplicação da irradiação.

A irradiação interage com os ciclos orgânicos de duas formas: diretamente nos componentes celulares, causando quebras na fita dupla do DNA por meio da indução de radicais livres, ou a indução de reações reativas espécies de oxigênio nos tecidos-alvo (ASSAD et al., 2018). Doses menores de radiação resultam em baixos níveis de morte celular nas primeiras horas, conforme estudo já realizado para a linhagem SCC-9 (ROBERG et al., 2007). No entanto, muitas delas já apresentam vacúolos autofágicos, indicando início de mecanismos de reparo nessas células nas primeiras 28 h. Alterações como apoptose, encolhimento celular, núcleos fragmentados e corpos apoptóticos necessitam de mais horas para serem detectados, aproximadamente 52 h (ROBERG et al., 2007).

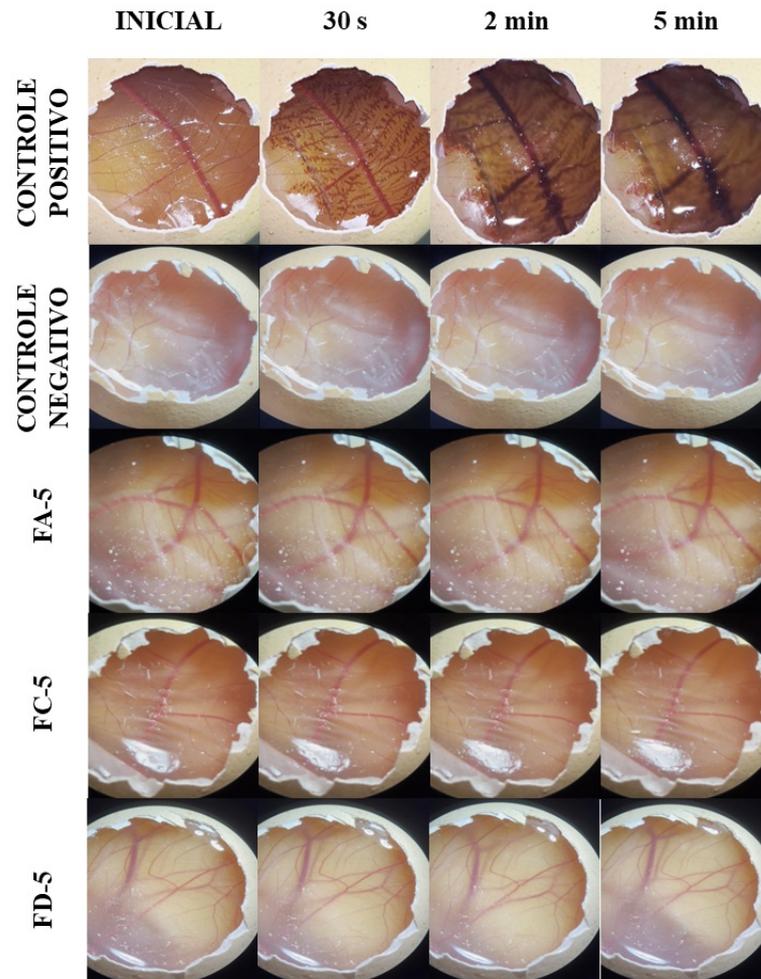
Os dados apresentados demonstram que o tratamento somente com curcumina pode ser mais efetivo do que doses únicas de radioterapia e que, nessas condições, a associação do tratamento com curcumina à radioterapia não resultaria em benefícios significativos.

## 5.12 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS FILMES

### 5.12.1 HET-CAM

O método HET-CAM inicialmente relatado por Luepke (LUEPKE, 1985) foi desenvolvido para compor estudos de embriotoxicidade, teratogenicidade, efeitos sistêmicos, metabólicos e imunológicos para ser aplicado em testes de irritação de membranas mucosas. Posteriormente, foi amplamente adotado para avaliação do potencial irritativo de produtos oculares como alternativa ao teste de Draize, realizado em coelhos (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2018). Apesar de ser inicialmente empregado para produtos de aplicação ocular, esse teste vem sendo utilizado para avaliação do potencial irritativo em outros tecidos como mucosa vaginal, bucal, nasal e pele (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2018; WANNAPHATCHAIYONG et al., 2019; PEREIRA et al., 2021).

Os resultados referentes à avaliação do potencial irritativo dos filmes estão apresentados na Figura 49.



**Figura 49.** Sequência ilustrativa dos registros fotográficos realizados durante o ensaio de HET-CAM demonstrando o efeito com controle positivo (NaOH 1,0 mol/L), controle negativo (PBS), e solução contendo cada um dos filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) solubilizado em água na membrana cório-alantoide após 30s, 2 min e 5 min da aplicação.

As imagens apresentadas na Figura 49 foram capturadas no momento anterior à aplicação da formulação e 30 s, 2 min e 5 min após o fim da exposição à formulação. Durante esse período, com a utilização do controle positivo, foram observadas alterações como visualização de capilares que não eram visíveis anteriormente ou dilatação dos vasos já visíveis (hiperemia), vazamento de sangue difuso dos vasos e capilares (hemorragia), ruptura do fluxo sanguíneo nos vasos (coagulação) e aparência de opacidade total ou parcial da membrana (opacidade) (DELGADO et al., 2023).

Observa-se que o controle negativo (Solução salina a 0,9%) não apresentou nenhum desses fenômenos durante o período o teste. As amostras FA-5, FC-5 e FD-5 tiveram efeito bem semelhante ao encontrado no controle negativo, sem que houvesse a apresentação de nenhum desses eventos vasculares durante o período de realização do ensaio.

O índice de irritabilidade das amostras e dos controles ainda foram calculados e os resultados foram expressos com a média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos nos três ovos

analisados para cada formulação, conforme apresentado na Tabela 15.

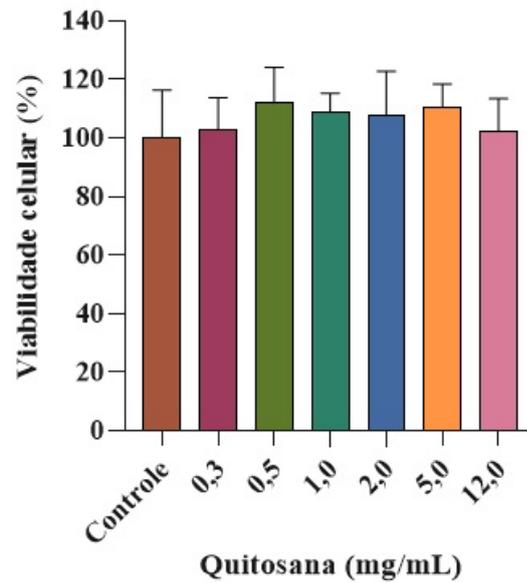
**Tabela 15.** Índice de irritabilidade encontrado após aplicação do teste de HET-CAM para controle positivo, controle negativo e filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) e sua respectiva classificação. Resultados representados com média ( $n=3$ )  $\pm$  DP.

<b>Amostras</b>	<b>Índice de irritabilidade</b>	<b>Classificação</b>
Controle positivo	$19,0 \pm 0,2$	Irritante Severo (IS)
Controle negativo	$0,1 \pm 0,0$	Não irritante (NI)
FA-5	$0,1 \pm 0,0$	Não irritante (NI)
FC-5	$0,1 \pm 0,0$	Não irritante (NI)
FD-5	$0,1 \pm 0,0$	Não irritante (NI)

Observa-se que o índice de irritabilidade do controle positivo foi de  $19,0 \pm 0,2$ , enquanto os índices do controle negativo e das formulações (FA-5, FC-5 e FD-5) foram de  $0,1 \pm 0,0$ . Dessa forma, o controle positivo foi classificado como irritante severo e o controle negativo e as formulações como não irritante. Esse resultado sugere uma segurança da formulação em relação ao potencial irritativo e isso é de extrema importância para esse tipo de formulação, considerando que ela vai ficar aderida a pele por algumas horas em contato com tecidos saudáveis.

### 5.12.2 MTT com a quitosana

Outra forma de verificar a segurança de uma formulação é a avaliação da citotoxicidade dos seus componentes por meio do ensaio de viabilidade celular. Conforme demonstrado no item 5.11.1, a curcumina possui ação citotóxica seletiva contra células tumorais. Dessa forma, também foi avaliado o perfil de citotoxicidade da quitosana, que é o principal agente de mucoadesão dos filmes desenvolvidos. Para esse ensaio, foram avaliadas 5 concentrações de quitosana (0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 12,0 mg/mL) e os resultados estão demonstrados na Figura 50.



**Figura 50.** Efeito da quitosana na viabilidade da linhagem celular HaCaT. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para os dados de viabilidade celular. Devido à manutenção da viabilidade celular não foi possível calcular a IC<sub>50</sub> a partir da curva dose-resposta obtida. Os dados estão representados pela média ± desvio padrão (n = 9).

Os resultados mostram que a quitosana não diminuiu a viabilidade celular nos queratinócitos (HaCaT), mantendo-a entre 102,4 e 111,9% para HaCaT após 24 h de tratamento, mesmo em altas concentrações, quando comparado ao quantitativo presente nos filmes. Dessa forma, a quitosana foi classificada como não citotóxica (LÖNNROTH, 2005). Observa-se ainda que não há diferença estatística entre as concentrações testadas, mantendo-se segura mesmo quando há um aumento na concentração desse polímero. Esses resultados sugerem uma ausência de toxicidade nas concentrações testadas, assegurando a baixa toxicidade do sistema de liberação em si para a pele saudável.

## 6. CONCLUSÕES

---

O método de extração de curcumina otimizado foi capaz de recuperar altas proporções de curcumina das camadas da pele e mucosa, considerando o grande desafio que é remover este fármaco tão lipofílico de membranas biológicas. O método analítico proposto foi capaz de quantificar de maneira seletiva, com precisão e exatidão desde pequenas concentrações de curcumina na presença das matrizes biológicas, permitindo sua utilização em estudos *in vitro* para o desenvolvimento e controle de qualidade de novas formulações para aplicação tópica contendo o ativo natural.

Foram desenvolvidos três filmes (FA-5, FC-5 e FD-5) compatíveis com os requisitos para uso dermatológico, com incorporação de um fármaco com características desafiadoras, como a baixa solubilidade de meios aquosos e a instabilidade química frente a variações de pH. Houve compatibilidade química entre o fármaco e os excipientes selecionados para a produção dos filmes. Os ensaios de caracterização dos filmes obtidos, ou seja, aspecto, peso, espessura, resistência à dobradura, pH, doseamento, índice de intumescimento, força de ruptura, mucoadesividade e morfologia foram capazes de diferenciar os filmes desenvolvidos entre si. Além disso, demonstraram ser estáveis por um período de 90 dias em temperatura ambiente.

Os três filmes selecionados a partir dos ensaios de caracterização apresentaram controle na liberação da curcumina nas primeiras horas e apresentaram intumescimento suficiente para estimular a penetração do fármaco tanto na pele quanto na mucosa, mesmo em condições desafiadoras, como presença de saliva, demonstrando sua aplicabilidade terapêutica.

Os ensaios em culturas celulares demonstraram que a quantidade de fármaco que penetrou a mucosa foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade celular de três linhagens tumorais e demonstrou ser mais eficiente em relação a doses únicas de radioterapia, evitando assim os inúmeros efeitos colaterais relacionados a essa terapia.

Os filmes desenvolvidos não apresentaram irritabilidade para a pele e mucosa, demonstrando ser uma alternativa segura para aplicação nesses tecidos, sendo essa uma característica importante, considerando o tempo de contato entre a formulação e os tecidos.

Assim, os filmes desenvolvidos contendo quitosana em sua composição parecem ser uma alternativa promissora para o tratamento de câncer de pele e boca utilizando a curcumina.

## 7. REFERÊNCIAS

---

ABOUHUSSEIN, D. et al. Cetylpyridinium chloride chitosan blended mucoadhesive buccal films for treatment of pediatric oral diseases. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101676>>.

ABRUZZO, A. et al. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 581–588, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.024>>.

AGGARWAL, B. B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, v. 23, n. 1 A, p. 363–398, 2003.

ALEXANDER, A. et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 1, p. 26–40, 2012.

ALINEZHAD, V. et al. Utilization of curcumine and nanocurcumine compounds in cancer therapy. **Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 3, n. 3, p. 1–11, 2017.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505–518, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.028>>.

ANGELO, T. et al. Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1022, p. 81–86, 1 jun. 2016.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017** Diário Oficial da União, , 2017. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412)>.

ARAFA, M. G. et al. Propolis-based niosomes as oromuco-adhesive films: A randomized clinical trial of a therapeutic drug delivery platform for the treatment of oral recurrent aphthous ulcers. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

ARGIRIS, A., KARAMOUZIS, M. V., RABEN, D., & FERRIS, R. L. Head and neck cancer. **The Lancet**, v. 371, p. 1695–1709, 2008.

ASSAD, D. X. et al. Additive cytotoxic effects of radiation and mTOR inhibitors in a cervical cancer cell line. **Pathology Research and Practice**, v. 214, n. 2, p. 259–262, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2017.10.019>>.

AYCAN, D.; YAYLA, N. A.; AYDIN, Y. A. Chitosan polyvinyl alcohol blend films for ibuprofen encapsulation: Fabrication, characterization and kinetics. **Polymer Degradation and Stability**, v. 181, 1 nov. 2020.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: Clinical features. **Oral Oncology**, v. 46, n. 6, p. 414–417, 2010.

BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh**

**Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 115–118, 2017.

BANSAL, S.; DESTEFANO, A. Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules. **AAPS Journal**, v. 9, n. 2, p. 109–114, 2007.

BARRY, J. et al. Determining the effects of lipophilic drugs on membrane structure by solid-state NMR spectroscopy: The case of the antioxidant curcumin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 12, p. 4490–4498, 2009.

BASKAR, D.; SAMPATH KUMAR, T. S. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 767–772, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.013>>.

BASNET, P.; SKALKO-BASNET, N. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4567–4598, jun. 2011.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p. 167–223, 2001.

BHARADWAJ, R. et al. Combinatorial therapeutic approach for treatment of oral squamous cell carcinoma. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 572–585, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1573176>>.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal Stem Cells of the Skin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 339–376, 2006.

BORGES, G. A. et al. Curcumin downregulates the PI3K–AKT–mTOR pathway and inhibits growth and progression in head and neck cancer cells. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 12, p. 3311–3324, 2020.

BOUWSTRA, J. A. et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 1, p. 1–36, 2003.

BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 12, p. 2080–2095, dez. 2006.

BRUSCHI, M. L.; DE FREITAS, O. Oral Bioadhesive Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 293–310, 1 mar. 2005.

CAMPOS, P. M.; PRAÇA, F. S. G.; BENTLEY, M. V. L. B. Quantification of lipoic acid from skin samples by HPLC using ultraviolet, electrochemical and evaporative light scattering detectors. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 1019, p. 66–71, 2015.

CATANZARO, J. M.; GRAHAM SMITH, J. Propylene Glycol Dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 24, n. 1, p. 90–95, 1991.

CHAUHAN, S. et al. Development, optimization and evaluation of curcumin loaded biodegradable crosslinked gelatin film for the effective treatment of periodontitis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 7, p. 1212–1221, 2018.

CHOUDHARI, A. S. et al. Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2020.

CIAPETTI, G. et al. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. **Biomaterials**, v. 14, n. 5, p. 359–364, 1993.

COSTA, R. H. F. et al.  $\alpha$ -Cyclodextrin-based poly(pseudo)rotaxane for antifungal drug delivery to the vaginal mucosa. **Carbohydrate Polymers**, v. 302, 2023.

CRAYTHORNE, E.; AL-NIAMI, F. Skin cancer. **Medicine**, v. 45, n. 7, p. 431–434, 2017.

DA SILVA, F. A. et al. Perfil Epidemiológico dos Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço em um Centro Oncológico no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n. 1, 31 mar. 2020.

DANIEL, J. S. P. et al. Erythromycin-excipients compatibility studies using the thermal analysis and dynamic thermal infrared spectroscopy coupled with chemometrics. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 143, n. 4, p. 3127–3135, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10973-020-09691-y>>.

DE MATOS, R. P. A. et al. Effect of Curcumin-Nanoemulsion Associated with Photodynamic Therapy in Cervical Carcinoma Cell Lines. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

DE PAULA, D. et al. Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies. **Biomedical Chromatography**, v. 22, p. 1416–1423, 2008. Disponível em: <[www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)>.

DELGADO, I. F. et al. **ATLAS DO MÉTODO HET-CAM: Protocolo ilustrado aplicado à avaliação de toxicidade ocular**. [s.l.: s.n.]

DESHPANDE, S. S. et al. Synthesis of biocompatible chitosan coated TiO<sub>2</sub>-curcumin nanocomposites shows potent anticancer activity towards melanoma cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 85, n. May, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104592>>.

DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, 2006.

ELKASHTY, O. A.; ASHRY, R.; TRAN, S. D. Head and neck cancer management and cancer stem cells implication. **Saudi Dental Journal**, v. 31, n. 4, p. 395–416, 1 out. 2019.

EOUANI, C. et al. In-vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 1, p. 45–55, 2001.

ERAWATI, T.; ISADIARTUTI, D.; ANGGALIH, B. D. The effect of polysorbate 20 and polysorbate 80 on the solubility of quercetin. **Journal of Public Health in Africa**, v. 14, n. S1, p. 25–29, 2023.

ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin-from molecule to biological function. **Angewandte Chemie**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 2012.

FADEEL, D. A.; KAMEL, R.; FADEL, M. PEGylated lipid nanocarrier for enhancing photodynamic therapy of skin carcinoma using curcumin: in-vitro/in-vivo studies and histopathological examination. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67349-z>>.

FONSECA-GARCÍA, A.; JIMÉNEZ-REGALADO, E. J.; AGUIRRE-LOREDO, R. Y. Preparation of a novel biodegradable packaging film based on corn starch-chitosan and poloxamers. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, 2021.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. **Materials Science and Engineering C**, v. 86, p. 129–143, 1 maio 2018.

GALIA E, NICOLAIDES E, HÖRTER D, LÖBENBERG R, REPPAS C, D. J. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 698–705, 1998.

GANIGER, S. et al. A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 64–69, 2007.

GARCIA, M. A.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. E. Physicochemical, water vapor barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. **Starch/Staerke**, v. 58, n. 9, p. 453–463, 2006.

GELFUSO, G. M. et al. Iontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting? **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 134, p. 408–412, 2015.

GENDEN, E. M. et al. Contemporary management of cancer of the oral cavity. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 267, n. 7, p. 1001–1017, 2010.

GIBSON, M. **Pharmaceutical preformulation and formulation: a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form** (B. Raton, Ed.), 2001. .

GIRISA, S. et al. From Simple Mouth Cavities to Complex Oral Mucosal Disorders - Curcuminoids as a Promising Therapeutic Approach. **ACS Pharmacology and Translational Science**, v. 4, n. 2, p. 647–665, 2021.

GIULIANO, E. et al. Mucosal applications of poloxamer 407-based hydrogels: An overview. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, 2018.

GORDON, R. Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 160–169, 2013.

GRATIERI, T. et al. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.

GREENMAN, J. Follicular pH and the Development of Acne. **International Journal of Dermatology**, v. 20, n. 10, p. 656–658, 1981.

GU, Z.; ALEXANDRIDIS, P. Drying of Poloxamer Hydrogel Films. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 1454–1470, 2004.

GUPTA, P. An overview of applications of mucoadhesive buccal film in Oral Medicine. **Alternative drug delivery system**, v. 9, n. 2, 2020.

HANSEN, S.; LEHR, C.-M.; SCHAEFER, U. F. Improved input parameters for diffusion models of skin absorption ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 251–264, 2013.

HEARNDEN, V. et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 1, p. 16–28, 2012.

HJORTH TENNESEN, H. I.; KARLSEN, J.; BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. Original papers Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 183, p. 116–122, 1986.

HORII, H. et al. Induction of Non-apoptotic Cell Death Cell Lines by *Rhinacanthus nasutus* Extract. **in vivo**, v. 26, p. 305–310, 2012.

HUNG, W. C. et al. Membrane-thinning effect of curcumin. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 11, p. 4331–4338, 1 jun. 2008.

ICH. **Q2(R1), Validation of analytical procedures: text and methodology**. [s.l: s.n.]

INCA. **INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>>. Acesso em: 9 jan. 2023a.

INCA. **Câncer de pele melanoma**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>>. Acesso em: 9 jan. 2023b.

INCA. **Diagnóstico precoce do câncer de boca** (INCA, Ed.) **Instituto Nacional do Câncer** Rio de Janeiro, 2022c. .

JADHAV, B. K.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. R. Development and validation of improved reversed phase-HPLC method for simultaneous determination of curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin. **Chromatographia**, v. 65, n. 7–8, p. 483–488, 2007.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M.; SAKARIAH, K. K. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3668–3672, 19 jun. 2002.

JIANG, T.; LIAO, W.; CHARCOSSET, C. Recent advances in encapsulation of curcumin in nanoemulsions: A review of encapsulation technologies, bioaccessibility and applications. **Food Research International**, v. 132, 2020.

JONES, V.; KATIYAR, S. K. Emerging phytochemicals for prevention of melanoma invasion. **Cancer Letters**, v. 335, n. 2, p. 251–258, 28 jul. 2013.

KALLINI, J. R.; HAMED, N.; KHACHEMOUNE, A. Squamous cell carcinoma of the skin: Epidemiology, classification, management, and novel trends. **International Journal of Dermatology**, v. 54, n. 2, p. 130–140, 2015.

KANATT, S. R. et al. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 2, p. 290–297, dez. 2012.

KEYVANI-GHAMSARI, S.; KHORSANDI, K.; GUL, A. Curcumin effect on cancer cells'

- multidrug resistance: An update. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 10, p. 2534–2556, 2020.
- KHAN, G. et al. Development and Evaluation of Biodegradable Chitosan Films of Metronidazole and Levofloxacin for the Management of Periodontitis. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 6, p. 1312–1325, 2016.
- KHUTORYANSKIY, V. V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 6, p. 748–764, 2011.
- KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 2011, 2006.
- KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. **Molecules**, v. 24, n. 16, 13 ago. 2019.
- KUMAR, A.; VIMAL, A.; KUMAR, A. Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 615–622, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.054>>.
- KUNNUMAKKARA, A. B.; ANAND, P.; AGGARWAL, B. B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 199–225, 2008.
- LAO, C. D. et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, 2006.
- LEITER, U.; KEIM, U.; GARBE, C. Epidemiology of Skin Cancer: Update 2019. In: REICHRATH, J. (Ed.). **Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer**. 3 ed ed. Homburg: 2019, 2019. p. 123–139.
- LESTARI, M. L. A. D.; INDRAYANTO, G. **Curcumin Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, 2014. .
- LINARES, M. A.; ZAKARIA, A.; NIZRAN, P. Skin Cancer. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 42, n. 4, p. 645–659, 2015.
- LIU, B.; ZHANG, J.; GUO, H. Research Progress of Polyvinyl Alcohol Water-Resistant Film Materials. **Membranes**, v. 12, n. 3, 2022.
- LIU, H. et al. Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch-chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 588–597, 2013a.
- LIU, J. et al. Fabrication of double crosslinked chitosan/gelatin membranes with Na<sup>+</sup> and pH dual-responsive controlled permeability. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 1–9, 2020.
- LIU, L. et al. Progress in targeted therapeutic drugs for oral squamous cell carcinoma. **Surgical Oncology**, v. 31, p. 90–97, 2019.
- LIU, P. et al. Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 2, p. 748–756, jun. 2013b.
- LÖNNROTH, E. C. Toxicity of medical glove materials: A pilot study. **International Journal**

of **Occupational Safety and Ergonomics**, v. 11, n. 2, p. 131–139, 2005.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287–291, 1985.

LUO, K. et al. Mucoadhesive and elastic films based on blends of chitosan and hydroxyethylcellulose. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 2, p. 184–192, 2008.

MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R. M. Non-melanoma skin cancer. **The Lancet**, v. 375, n. 9715, p. 673–685, 2010.

MADSEN, K. D. et al. Development of an ex vivo retention model simulating bioadhesion in the oral cavity using human saliva and physiologically relevant irrigation media. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 2, p. 373–381, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.031>>.

MANOHAR, S. D.; SRIDHAR, D. A.; MALLIKARJUNA, S. C. Drug delivery from the oral cavity: A focus on mucoadhesive buccal drug delivery systems. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 66, n. 5, p. 466–500, 2012.

MARINHO, M. A. G. et al. Combination of Curcumin and Photodynamic Therapy Based on the Use of Red Light or Near-Infrared Radiation in Cancer: A Systematic Review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 17, p. 2985–2997, 2022.

MATOS, B. N. et al. Chitosan nanoparticles loading oxaliplatin as a mucoadhesive topical treatment of oral tumors: Iontophoresis further enhances drug delivery ex vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 1265–1275, 2020.

MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. **Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011. .

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUQBIL, I. et al. Progress in nanotechnology based approaches to enhance the potential of chemopreventive agents. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 428–445, 2011.

MURUGAN, A. K. mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. **Seminars in Cancer Biology**, v. 59, p. 92–111, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.07.003>>.

NAIR, A. B. et al. In vitro techniques to evaluate buccal films. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 1, p. 10–21, 2013.

NELSON, K. M. et al. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1620–1637, 2017.

NEPAL, P. R.; HAN, H. K.; CHOI, H. K. Enhancement of solubility and dissolution of Coenzyme Q10 using solid dispersion formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 147–153, 2010.

NEVILLE, B.; DAY, T. Oral cancer and precancerous lesions. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 4, p. 195–215, 2002.

NG, K. W.; LAU, W. M. Skin deep: The basics of human skin structure and drug penetration. In: **Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 3–11.

NIU, T. et al. Inhibition of Autophagy Enhances Curcumin United light irradiation-induced Oxidative Stress and Tumor Growth Suppression in Human Melanoma Cells. **Scientific Reports**, v. 6, 8 set. 2016.

ÖHMAN, H.; VAHLQUIST, A. The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: A clue to the molecular origin of the “acid skin mantle”? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 4, p. 674–677, 1998.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R. et al. Testing vaginal irritation with the Hen’s Egg Test-Chorioallantoic Membrane assay. **Altex**, v. 35, n. 4, p. 495–503, 2018.

PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PATEL, V. M.; PRAJAPATI, B. G.; PATEL, M. M. Design and characterization of chitosan-containing mucoadhesive buccal patches of propranolol hydrochloride. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, n. 1, p. 61–72, 2007.

PEREIRA, M. N. et al. Nanostructured lipid carriers for hair follicle-targeted delivery of clindamycin and rifampicin to hidradenitis suppurativa treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 197, p. 111448, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111448>>.

PHATALE, V. et al. Overcoming skin barriers through advanced transdermal drug delivery approaches. **Journal of Controlled Release**, v. 351, n. May, p. 361–380, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.025>>.

PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, 2009.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.

REIS, T. A. et al. Simple and selective HPLC-UV/Vis bioanalytical method to determine aluminum phthalocyanine chloride in skin permeation studies. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, p. 1–7, 2018.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 11884–11894, 2015.

ROBERG, K. et al. Radiotherapy response in oral squamous carcinoma cell lines: evaluation of apoptotic proteins as prognostic factors. **Head and Neck**, v. 29, n. 4, p. 324–34, 2007.

- RUBIN, A. I.; CHEN, E. H.; RATNER, D. Basal-Cell Carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, p. 2262–2269, 2005. Disponível em: <www.nejm.org>.
- RUDOLPH, R.; ZELAC, D. E. Squamous cell carcinoma of the skin. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 114, n. 6, 2004.
- SAJADIMAJD, S. et al. Advances on Natural Polyphenols as Anticancer Agents for Skin Cancer. **Pharmacological Research**, v. 151, 1 jan. 2020.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018.
- SHARMA, R. et al. Recent advances in biopolymer-based mucoadhesive drug delivery systems for oral application. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 91, p. 105227, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105227>.
- SHARMA, R. A. et al. Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin: Biomarkers of Systemic Activity and Compliance. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 6847–6854, 2004.
- SHEN, L.; JI, H. F. The pharmacology of curcumin: Is it the degradation products? **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 3, p. 138–144, mar. 2012.
- SHOJAEI, A. H. Buccal Mucosa As A Route For Systemic Drug Delivery: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 15–30, 1998. Disponível em: <www.ualberta.ca/~csps>.
- SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 8–42, 1 fev. 2015.
- SLABBER, C. A.; GRIMMER, C. D.; ROBINSON, R. S. Solution Conformations of Curcumin in DMSO. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 10, p. 2726–2730, 2016.
- SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556–1568, 3 nov. 2005.
- SQUIER, C. A.; COX, P.; WERTZ, P. W. Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 96, n. 1, p. 123–126, 1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12515931>.
- STIE, M. B. et al. Swelling of mucoadhesive electrospun chitosan/polyethylene oxide nanofibers facilitates adhesion to the sublingual mucosa. **Carbohydrate Polymers**, v. 242, 2020.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.
- TENNESEN, H. H.; KARLSEN, J.; HENEGOUWEN, G. B. van. Original papers Studies on curcumin and curcuminoids Originalarbeiten. **Physics**, v. 183, p. 116–122, 1986.
- THIRAWONG, N. et al. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An in vitro evaluation using texture analyzer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 132–140, ago. 2007.

- TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Studies on curcumin and curcuminoids - V. Alkaline Degradation of Curcumin. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 180, n. 2, p. 132–134, 1985.
- VANJERI, V. N. et al. Thermal and tensile properties study of 4-Hydroxycoumarin doped Polyvinyl alcohol/Chitosan blend films. **Chemical Data Collections**, v. 23, 1 out. 2019.
- VECCHI, C. F. et al. Mucoadhesive polymeric films comprising polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, and poloxamer 407 for pharmaceutical applications. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 26, n. 2, p. 138–149, 2021.
- VIGATO, A. A. et al. Physico-chemical characterization and biopharmaceutical evaluation of lipid-poloxamer-based organogels for curcumin skin delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.
- VLLASALIU, D. et al. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1–2, p. 183–193, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.020>>.
- WANASATHOP, A. et al. Permeability of buccal mucosa. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2021.
- WANG, Y.-J. et al. **Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. [s.l: s.n.].
- WANNAPHATCHAIYONG, S. et al. Lidocaine loaded gelatin/gelatinized tapioca starch films for buccal delivery and the irritancy evaluation using chick chorioallantoic membrane. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 8, p. 1085–1095, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.09.005>>.
- WAYS, T. M. M.; LAU, W. M.; KHUTORYANSKIY, V. V. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. **Polymers**, v. 10, n. 3, 2018.
- WEINBERG, R. A. **The biology of CANCER** (G. Science, Ed.) New York, 2013. .
- WHO. **Cancer**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)>. Acesso em: 7 nov. 2022.
- WHO. **Global cancer burden growing, amidst mounting need for services**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>>. Acesso em: 2 fev. 2024.
- WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 10, p. 98–110, 2006.
- WOODLEY, J. Bioadhesion. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 2, p. 77–84, 2001a.
- WOODLEY, J. Bioadhesion New Possibilities for Drug Administration? **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 2, p. 77–84, 2001b.
- YALLAPU, M. M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Curcumin nanoformulations: A future nanomedicine for cancer. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 1–2, p. 71–80, 2012.

ZAIDI, Z.; LANIGAN, S. W. Skin: Structure and Function. In: **Dermatology in Clinical Practice**. London: Springer London, 2010. p. 1–15.

ZHU, J. et al. Potential roles of chemical degradation in the biological activities of curcumin. **Food and Function**, v. 8, n. 3, p. 907–914, 2017.