

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACUDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

LARISSA MARIA ARAÚJO DE MELO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA
CONTENDO OXALIPLATINA**

BRASÍLIA – DF

Junho/2016

LARISSA MARIA ARAÚJO DE MELO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA
CONTENDO OXALIPLATINA**

Trabalho de conclusão de curso da aluna
Larissa Maria Araújo de Melo,
apresentado ao Departamento de Farmácia
da Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília, como requisito
parcial para obtenção do grau de
Farmacêutica

Orientador: Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Co-orientador: Msc. Breno N. Matos

BRASÍLIA
JUNHO/ 2016

LARISSA MARIA ARAÚJO DE MELO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA
CONTENDO OXALIPLATINA**

Parte manuscrita do Trabalho de Graduação da aluna **Larissa Maria Araújo de Melo**, apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutica

Aprovada em 28 de junho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Guilherme M. Gelfuso

Universidade de Brasília

Orientador

Prof. Ms. Tamara Ângelo

Universidade de Brasília

Examinadora

DEDICATÓRIA

Em memória de minha mãe, Rita Martins de Araújo.
Aos alunos e professores do Curso de Farmácia da UnB.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Geraldo, que sempre me apoiou, e esteve pronto a me dar todo o suporte necessário.

A minha irmã Letícia, por sempre me ajudar quando podia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Gelfuso, que sempre teve a paciência em incentivar e impulsionar na busca de conhecimento.

Ao Laboratório de Tecnologia de Alimento, Medicamentos e Cosméticos (LTMAC), em principal, o aluno doutorando Breno Noronha Matos, por estar sempre disposto a ajudar no que fosse necessário.

Aos alunos do laboratório de Controle de qualidade de medicamentos, principalmente a Márcia, por sempre estar disposta a ajudar na utilização dos equipamentos do laboratório.

Ao laboratório de genética e morfologia do IB, por deixar utilizar os equipamentos para o desenvolvimento do trabalho.

As amigas de curso, Giselly, Maíra, Louise e Rayane, por toda a ajuda e apoio em todos os momentos.

RESUMO

Carcinomas de cabeça e pescoço, incluindo os cânceres originários da cavidade oral, representam um dos tipos mais frequentes de câncer em todo o mundo. Apesar de estar sendo cada vez mais incorporada em protocolos de tratamento, a quimioterapia sistêmica induz altas taxas de eventos adversos, como fortes enjoos e problemas gastrointestinais, queda de cabelo, entre outros, o que muitas vezes representam um fator limitante para o sucesso global do tratamento. Neste cenário, um sistema tópico tanto para o tratamento de primeira linha como neoadjuvante seria altamente recomendado. Este projeto propôs o preparo de nanopartículas de Poli ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA) encapsulando a oxaliplatina (Nano-OXP) para futura incorporação em formulações mucoadesivas para tratamento tópico de tumores orais. As partículas de PLGA foram obtidas por meio da técnica de dupla emulsificação. Nano-OXP foram caracterizadas pelo seu tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação. A liberação do fármaco foi determinada *in vitro* durante um período de 12 h, utilizando membrana de acetato de celulose (0,22 μ m) acoplada a uma célula de difusão do tipo Franz modificada a 34°C, comparando a liberação de uma solução aquosa do fármaco. As Nano-OXP obtiveram diâmetro médio de $490,1 \pm 153,11$ nm, PDI $0,305 \pm 0,17$, potencial zeta de $-2,96 \pm 0,05$ mV. A eficiência de encapsulação foi de $60,64 \pm 0,15$ %. As partículas foram capazes de controlar a liberação do fármaco 2 vezes mais a partir da quinta hora do estudo. Portanto, as Nano-OXP parecem ser uma alternativa viável para o tratamento dos cânceres orais, visto que a formulação foi capaz de controlar a liberação do fármaco, possibilitando uma maior disponibilidade da OXP no local do tumor.

Palavras chaves: Câncer, PLGA, Oxaliplatina, nanopartículas

ABSTRACT

Head and neck carcinomas, including oral cavity cancers, represent one of the most common cancers worldwide. Despite being increasingly incorporated into protocols treatment, systemic chemotherapy induces high rates of events such as strong nausea and gastrointestinal problems, hair loss, among others, which often represent a limiting factor for the overall success of treatment . In this setting, a topical system for both the first-line treatment as neoadjuvant would be highly recommended. This work proposed the preparation of PLGA nanoparticles encapsulating the OXP (Nano-OXP), to be incorporated in mucoadhesive formulations for topical treatment of oral tumors. PLGA particles were obtained by double emulsification technique. Nano-OXP were characterized by their size, polydispersity index (PDI), and zeta potential encapsulation efficiency. The drug release was determined in vitro for a 12 hour period, using cellulose acetate membrane (0.22 μM) coupled to a Franz type diffusion cell at 37°C by comparing the release of a mere release of an aqueous solution of the drug. The Nano-OXP had a mean diameter of 490.1 ± 153.11 nm, PDI 0.305 ± 0.17 , zeta potential of $- 2.96 \pm 0.05$ mV. The encapsulation efficiency was $60.64 \pm 0.15\%$. The particles were capable to controlling drug release 2 times from the fifth hour of the study. Therefore, the nano-OXP appear to be a viable alternative for the treatment of oral cancers, since the formulation is able to control drug release, allowing a greater availability of OXP at the tumor site.

Keywords: Cancer, PLGA, oxaliplatin, nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da cavidade oral.	3
Figura 2: Estrutura molecular da cisplatina e carboplatina.	6
Figura 3: Estrutura molecular da oxaliplatina (OXP).....	7
Figura 4: Esquema que mostra mecanismo de ação da OXP.	7
Figura 5: Aduto de DNA com OXP. (PEREGO et al, 2016)	8
Figura 6: Representação de Nanocápsulas e Nanoesferas.	10
Figura 7: Estrutura do PLGA	10
Figura 8: Hidrólise do PLGA	11
Figura 9: Célula de difusão do tipo Franz montada para a realização da liberação.	15
Figura 10: Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura no aumento de 4.000x.	18
Figura 11: Perfil de liberação da OXP a partir das Nano-OXP em comparação à difusão do fármaco dissolvido em água, utilizado como controle.	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Eficiência de encapsulação obtida com diferentes proporções polímero/fármaco .	17
Tabela 2: Tabela onde mostra tamanho da partícula, PDI e potencial zeta.	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DACH	Diaminociclohexano
EE%	Eficiência de encapsulação
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
HPV	Vírus do papiloma humano
Nano-OMP	Nanopartículas de PLGA contendo a oxaliplatina
OMP	Oxaliplatina
PDI	Índice de polidispersão
PLGA	Poli ácido lático-co-ácido glicólico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	2
	2.1 Objetivos específicos:.....	2
3	REFERENCIAL TEÓRICO	3
	3.1 Câncer de cavidade oral.....	3
	3.2 Diagnóstico e tratamento	5
	3.3 Oxaliplatina	6
	3.4 Nanomedicina.....	8
	3.5 Nanopartículas poliméricas	9
	3.6 PLGA.....	10
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
	4.1 Material.....	13
	4.2 Método analítico	13
	4.3 Obtenção das nanopartículas	13
	4.4 Caracterização das nanopartículas.....	14
	4.5 Morfologia.....	14
	4.6 Eficiência de encapsulação.....	14
	4.7 Liberação da OXP a partir das Nano-OXP.....	15
	4.8 Análise dos dados	16
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6	CONCLUSÕES.....	21
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo atual, com uma alta taxa de morbidade (MOURA et al, 2014). De todos os tipos de tumores, cerca de 2% da população mundial é acometida por tumores na região oral, sendo que 90% dos tumores orais são de células epidermóides (YANG et al, 2013). Como tratamento recorre-se à cirurgia para retirada do tumor e à quimioterapia como tratamento adjuvante (RAHAL et al, 2015) além de seções de radioterapia (CHANG et al, 2008). Muitos tratamentos quimioterápicos disponíveis para esse tipo de tumor são feitos com complexos de coordenação da platina, como a cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.

Dessa classe de agentes quimioterápicos, a oxaliplatina (OXP) é um fármaco de terceira geração, eficaz para esse tipo de tumor sólido (YANG et al, 2013). Entretanto, a quimioterapia sistêmica com este fármaco ainda apresenta importantes reações adversas, como náuseas, vômitos, anorexia, queda de cabelo, entre outros eventos indesejáveis (RAHAL et al, 2015). Mas o principal efeito adverso da OXP, é sem dúvida, a ocorrência de casos de neuropatia periférica (BURTON et al, 2012).

Visando diminuir os efeitos adversos da terapia com a OXP, grande parte deles relacionado à sua administração sistêmica, propõe-se nesse trabalho o desenvolvimento de formulações para uso tópico desse agente quimioterápico. Assim, o presente trabalho propôs o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) que poderão ser incorporados em géis bioadesivos para promover uma liberação progressiva de fármaco no local de ação, ou seja, diretamente na região tumoral localizada na mucosa oral.

2 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas de PLGA encapsulando a OXP e verificar *in vitro* a sua cinética de liberação, para serem incorporadas no futuro a formulações tópicas para o tratamento de tumores da cavidade oral.

2.1 Objetivos específicos:

- Preparar nanopartículas de PLGA contendo OXP;
- Caracterizar as nanopartículas de OXP, avaliando-se seu diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação (EE%);
- Avaliar *in vitro* a cinética de liberação da OXP a partir das nanopartículas de PLGA.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer de cavidade oral

O câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo. No Brasil, consiste na segunda causa de morte por doenças (FERNANDES et al, 2013). Dentre todos os tipos de cânceres, cerca de 650.000 pessoas todo ano são diagnosticadas com câncer de cabeça e pescoço (BUSSMAN et al, 2016). Desse universo, o câncer da cavidade oral (Figura 1), dos quais 90% dos casos são de células epidermóides (YANG et al, 2013), é o sexto tipo de câncer que mais acomete a população e acontece mais em camadas desfavorecidas da sociedade (BROCKLEHURST et al, 2013). Isso se dá pelo fato de pessoas pertencentes a essas camadas sociais não terem acesso com frequência a dentistas e, com isso, há uma demora em se fazer o diagnóstico (MOURA et al, 2014). Mesmo com todos os avanços da medicina nos últimos 20 anos, as taxas de sobrevivência para pessoas com esse tipo de tumor é de apenas cinco anos (AFFONSO et al, 2015).

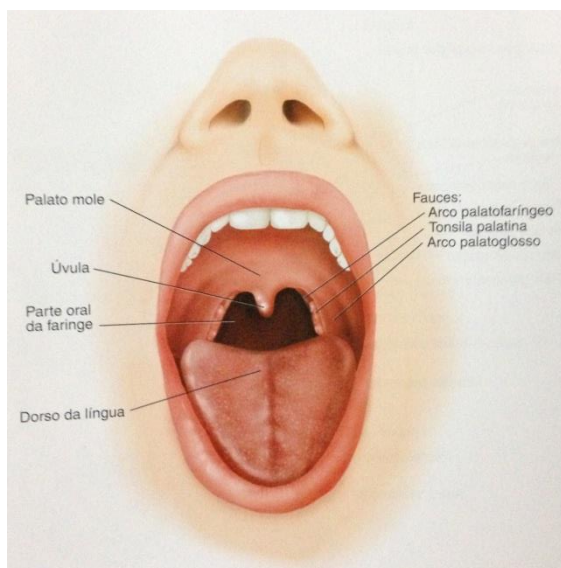


Figura 1: Esquema da cavidade oral (Tank & Gest, 2009).

A ocorrência de câncer está associada a uma exposição crônica a agentes cancerígenos, que acabam determinando anormalidades genéticas nas células teciduais. Quando esses problemas genéticos aparecem, determinam a ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores do organismo que levam as células a modificarem o seu ritmo de crescimento e multiplicação. Logo, essas células tendem a acumular mutações

genéticas adicionais, devido à sua instabilidade genômica. No final, essas células anormais adquirem um fenótipo maligno, em que elas perdem a capacidade natural de diferenciação, no qual têm um efeito destrutivo local e regional, podendo levar à metástase (BUNGET et al, 2013).

Geralmente, células presentes na cabeça e no pescoço expressam o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (VERMOKEN et al, 2008). O EGFR é encontrado em 80% dos pacientes com esse tipo de tumor (BENSON et al, 2016). Além do EGFR, outro receptor, o fator de E-caderina, tem correlação com o câncer oral de células epidermóides. É sabido que a transição de epitelial para mesenquimal é caracterizada pela diminuição das características epiteliais (como por exemplo, a perda de E-caderina) e a melhora dos atributos mesenquimais (como o aumento de enzimas proteolíticas, expressão de vimentina citoplasmática, fibronectina). Essa transição é descrita na invasão tumoral e metástase. A diminuição de E-caderina leva a uma redução da adesão intercelular, sendo um acontecimento comum em tumores. A vimentina citoplasmática é considerada uma indicação mesenquimal, parecendo ser um dos indicadores dessa transição em carcinomas, incluindo o carcinoma epidermóide (HU et al, 2016).

O uso de álcool, infecção com papiloma vírus (HPV), tabaco dentre outros são alguns fatores que podem favorecer o aparecimento e crescimento de tumores da mucosa oral (OSAZUWA-PETERS et al., 2015). O álcool etílico tem como primeiro metabólito o acetaldeído, que também está presente no tabaco, e essa substância é classificada como sendo do grupo 1 de carcinogenicidade (BROCKLEHURST et al, 2013). Apesar da associação do câncer oral com álcool e tabaco vir decrescendo nos últimos tempos, o mesmo não ocorre com a associação desse tipo de câncer com a incidência de HPV na população. Um aumento de cerca de 225% desta associação vem sendo observada desde os anos 80 (OSAZUWA-PETERS et al, 2015), sendo o HPV 16 o tipo de HPV em que essa relação é mais constante (AUSONI et al, 2016). Idade e gênero também são fatores que favorecem o aparecimento de câncer oral. Pessoas do sexo masculino são mais acometidas com esse tipo de tumor em relação a pessoas do sexo feminino (GRÖBE et al, 2015). Também se percebe um aumento do risco de desenvolver câncer oral com o aumento da idade das pessoas (BROCKLEHURST et al, 2013).

3.2 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico precoce da maioria dos cânceres é de fundamental importância para o sucesso do tratamento. A fase em que é feito o diagnóstico consiste no ponto crucial das ações a serem tomadas e que irão afetar o prognóstico do paciente (BROCKLEHURST et al, 2013). A retirada cirúrgica é importante, pois se consegue analisar a peça anatômica e patologicamente e assim saber a real extensão da doença para definir os parâmetros de prognóstico (FERNANDES et al, 2013). Porém, existe um risco na cirurgia de retirada do tumor, uma vez que a taxa de morbidade é da ordem de 3 a 7% (BROCKLEHURST et al, 2013), fazendo com que a qualidade de vida do paciente seja prejudicada, uma vez que a retirada cirúrgica pode acarretar perda de tecido duro e/ou mole, deformação facial, prejuízo da fala, além da dor que também é associada ao processo cirúrgico (MOURA et al, 2014). Mesmo existindo técnicas de reconstituição, as deformidades resultantes ainda são alarmantes, podendo, como foi dito acima, comprometer a qualidade de vida do paciente, prejudicando a mastigação e deglutição (MOURA et al, 2014). A complicação mais observada é o edema facial, mas que pode passar depois de algumas semanas (FERNANDES et al, 2013).

Quando não se faz a retirada cirúrgica do tumor, o prognóstico do tratamento é crítico e pode acarretar em uma sobrevida de meses (LUO et al, 2015). No entanto, se comprova a possibilidade cura do paciente fazendo um tratamento quimioterápico seguido de radioterapia sem a necessidade da retirada do tumor cirurgicamente (MELCHARDT et al, 2105).

Em geral, o tratamento quimioterápico é um pouco limitado devido a toxicidade e dos efeitos adversos dos medicamentos que afetam tanto as células cancerosas como as células saudáveis (LILA et al, 2014). A quimioterapia em tumores orais é feita muitas vezes como um tratamento adjuvante, depois se realizar o procedimento cirúrgico e a radioterapia (CHANG et al, 2008).

Geralmente, os fármacos utilizados para quimioterapia de tumores orais são 5-fluorouracila, taxanos (docetaxel e paclitaxel), cetuximabe e complexos de coordenação da platina: cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.

A 5-Fluorouracila é um fármaco análogo de pirimidina que necessita de conversão enzimática para exercer sua função (BRUNTON et al, 2012). Já os taxanos inibem a mitose pela ligação a β -tubulina e promovem a formação de microtúbulos (BRUNTON et al, 2012).

O Cetuximabe, um anticorpo monoclonal, liga-se ao domínio extracelular do EGFR impedindo assim a sinalização e dimerização do receptor dependente de ligante, fazendo então o bloqueio de sinais para o crescimento celular (BRUNTON et al, 2012).

Já os complexos de coordenação da platina se ligam de forma covalente a sítios nucleofílicos do DNA e funcionam como agentes alquilantes. A cisplatina e a carboplatina (Figura 2) são inorgânicos, divalentes e hidrossolúveis (BRUNTON et al, 2012).

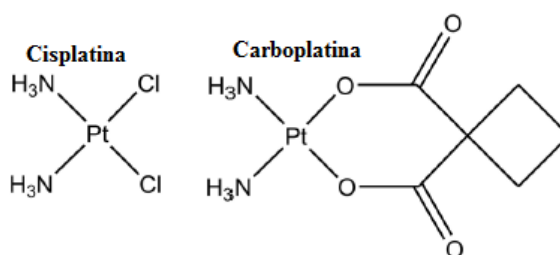


Figura 2: Estrutura molecular da cisplatina e carboplatina (PEREGO et al, 2016).

3.3 Oxaliplatina

A OXP (Figura 3), *trans-l*-diaminociclohexano oxalatoplatina, é um fármaco da terceira geração dos compostos de platina com ligante transportador 1,2 -diaminociclohexano (DACH), tendo uma ampla atividade anti-tumoral (ESPINOSA et al, 2005). Esse transportador DACH está localizado na 13q22 e é expresso em células epiteliais. Também é observado em diversos outros cânceres (ZHANG et al, 2016).

OXP difere dos outros complexos de platina e possui uma alta atividade contra câncer colorretal, podendo ser utilizado em tratamentos em que a cisplatina já não exerce efeito (PEREGO & ROBERT, 2015). É um fármaco eficaz para o tratamento de tumores orais (YANG et al, 2013), porém muitas vezes a OXP é utilizada em associações, principalmente quando ela apresenta baixa atividade antitumoral ocasionada pela baixa acumulação no tecido após a administração intravenosa e também devido a uma alta partição de eritrócitos (LILA et al, 2014).

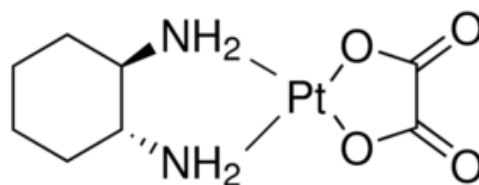


Figura 3: Estrutura molecular da oxaliplatina (OXP) (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/o9512?lang=pt®ion=BR>).

A OXP entra nas células por meio de um transportador ativo de Cu^{2+} (CTR1) e quando dentro da célula, degrada de forma rápida este transportador (Figura 4). Quando dentro da célula, o ligante oxalato é deslocado por uma molécula de água, o que vai formar uma molécula positiva e muito reativa, sendo assim citotóxica. Então essa espécie do fármaco reage com os sítios nucleofílicos do DNA e com proteínas (BRUNTON et al, 2012) e suprime a expressão da timidilato sintetase, que é a enzima alvo da ação da 5-FU, podendo ocorrer um sinergismo. Por esse motivo os dois são normalmente utilizados juntos para o tratamento de câncer colorretal (BRUTON et al, 2012).

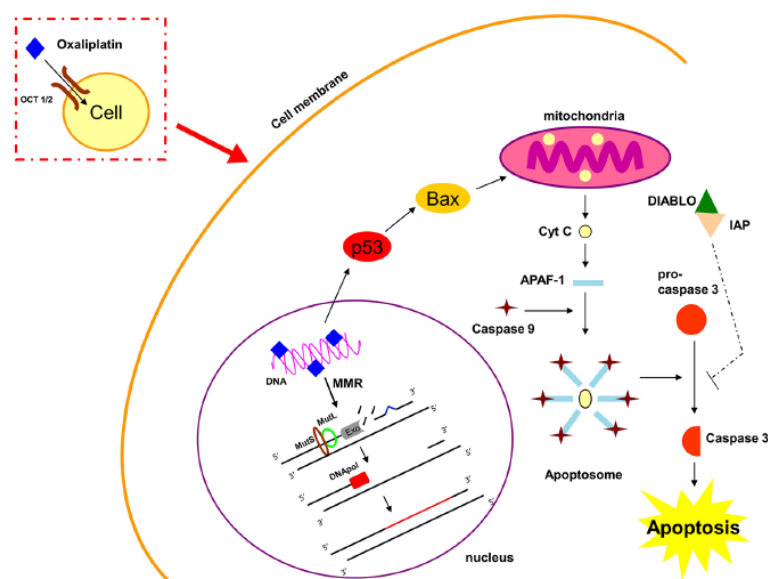


Figura 4: Esquema que mostra mecanismo de ação da OXP (PEREGO et al, 2016).

Mas, o mecanismo principal da OXP é a formação de adutos de DNA. O átomo de platina se liga de forma covalente na posição N^7 da guanina do DNA, formando assim ligações cruzadas inter e intra cadeia conforme figura 5 (PEREGO & ROBERT, 2015).

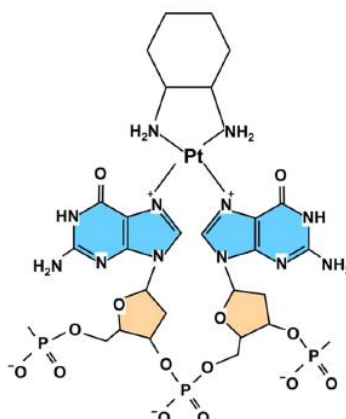


Figura 5: Aduto de DNA com OXP (PEREGO et al, 2016).

A OXP possui limite de dose devido a toxicidade, uma vez que pode causar neuropatia periférica, que pode se apresentar na forma de parestesia e/ou disestesia nos membros inferiores e superiores, na boca e na garganta. Isso se deve à rápida liberação de oxalato juntamente com a depleção de cálcio e magnésio. A OXP ainda pode causar leucemia, respostas alérgicas agudas, fibrose pulmonar, entre outros. Tem ainda uma toxicidade hematológica de leve a moderada, podendo causar citopenia mediada imunologicamente e náuseas (BRUNTON et al, 2012).

A OXP está no grupo de medicamentos que tem elevado risco de hipersensibilidade, juntamente com os taxanos, asparaginases e anticorpos monoclonais. As manifestações clínicas dessa hipersensibilidade podem ser erupção cutânea, eritema, prurido, falta de ar, espasmos bronquiais, entre outros (CASCAJARES et al, 2012).

3.4 Nanomedicina

Em alguns pacientes não é possível realizar a retirada cirúrgica de tumores e ainda pode ocorrer quimiorresistência e quimiossensibilidade (KANO, 2013). Levando em conta também a função da baixa disponibilidade da OXP nas células tumorais, é possível fazer uso da nanomedicina, que é uma aplicação da nanotecnologia em tratamentos, diagnósticos, prevenção de doenças (MEEL et al, 2013). Essa tecnologia pode ser utilizada em diversos momentos, como doenças do sistema nervoso central, doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias, porém a ênfase é tumores malignos (MEET et al, 2013).

No campo farmacêutico, existem diversas vantagens em se utilizar nanotecnologia, tais como melhorar a farmacocinética desfavorável e a distribuição de fármacos nos tecidos, aumentar a eficácia terapêutica por alcançar uma maior acumulação do fármaco no tecido alvo e reduzir os efeitos adversos por limitar a exposição do fármaco no tecido não-alvo. Existe ainda a possibilidade de uma terapia combinativa por administração direcionada de agentes terapêuticos múltiplos (MEEL et al, 2013). Além disso, essa tecnologia vem ganhando atenção devido à estabilidade e alta capacidade transportadora e também à possibilidade de aplicação em várias formas de administração (GUPTA et al, 2014). Por fim, nanocarreadores podem explorar as características fisiopatológicas dos tecidos tumorais que permitem a acumulação seletiva dentro do tecido tumoral que podem ser de forma passiva ou ativa (LILA et al, 2014).

3.5 Nanopartículas poliméricas

Atualmente existem muitos estudos relacionados com o desenvolvimento e aplicação de nanopartículas (KANO et al, 2014; VAN DER MEEL et al, 2013) . É importante compreender a estrutura e suas características para que assim se obtenha propriedades farmacêuticas para novas aplicações não disponíveis em materiais convencionais. O tamanho da partícula, a estrutura, a estabilidade e a composição são alguns dos desafios vistos nos estudos com nanopartículas para a liberação de fármacos. No entanto, alguns parâmetros tecnológicos como taxa de homogeneização, composição do polímero e métodos utilizados influenciam nas características das nanopartículas. Esses parâmetros podem levar a variações tanto no potencial zeta como no tamanho da partícula e essas variações também são importantes na passagem da nanopartícula para a célula (OZTURK et al, 2010).

As nanopartículas formadas com polímeros biodegradáveis, tanto naturais como sintéticos, vêm atraído atenção de pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas, por apresentarem maior estabilidade nos fluidos biológicos e também durante o armazenamento se comparadas a outras nanopartículas lipídicas, como os lipossomas (SCHAFFAZICK et al, 2003).

Nanopartículas poliméricas são um bom sistema de carreadores para liberação no alvo de antineoplásicos que podem acumular-se mais nos tumores e também prolongam a atividade do fármaco uma vez que tem uma liberação controlada (KANO, 2013; LILA et al, 2014, MIN et al., 2014). As nanopartículas poliméricas apresentam tamanho menor que 1µm e podem ser

organizadas na forma de nanoesferas ou nanocápsulas (Figura 6). As nanoesferas são constituídas por uma matriz polimérica na qual o fármaco pode estar adsorvido ou retido. Já as nanocápsulas são constituídas por uma capa polimérica distribuída ao redor de um núcleo oleoso podendo o fármaco estar adsorvido no polímero e/ou dissolvido no núcleo (SCHAFFAZICK et al, 2003).

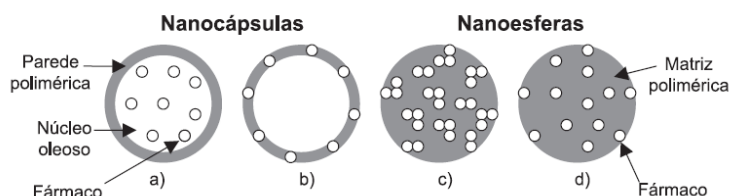


Figura 6: Representação de Nanocápsulas e Nanoesferas (Schaffazick et al, 2003).

3.6 PLGA

Os avanços em nanotecnologia e ciência dos materiais resultaram no desenvolvimento de polímeros que podem ser formulados na forma de carreadores para a liberação do fármaco de forma mais eficiente e, portanto, limitar os efeitos sistêmicos (MIN et al., 2014). Os polímeros podem ser quitosana, um polímero natural, ou de PLGA que consiste em um polímero sintético, entre outros (JAIN et al, 2010).

A quitosana é um polímero catiônico obtido a partir de um polissacarídeo natural denominado quitina existente no exoesqueleto de crustáceos, fungos e leveduras (Sarvaiya & Agrawal, 2014). Já o PLGA (Figura 7) é um polímero sintético preparado por meio de reações de condensação entre ácido láctico e ácido glicólico. A estrutura do PLGA é responsável pela principal característica do polímero: o curto tempo de degradação por hidrólise (MOTTA & DUEK, 2006).

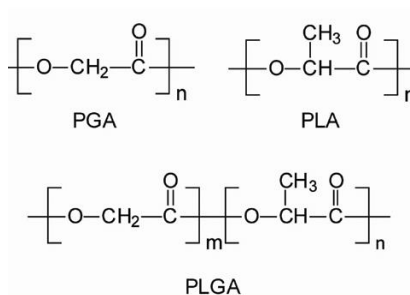


Figura 7: Estrutura do PLGA (Fonte: http://mslab.polymer.pusan.ac.kr/polymer/sub7/sub7_2.html).

Formulações de micro ou nanossistemas contendo PLGA possuem como vantagem o fornecimento de uma quantidade constante de fármaco durante um longo período de tempo, podendo variar de dias a meses (JAIN et al, 2010). Os fármacos carregados são geralmente liberados dos dispositivos por difusão e/ou por erosão do polímero ou mesmo por uma combinação de ambos os mecanismos (JAIN et al, 2010). Erosão é um dos mecanismos que desempenha um papel importante. Existem dois tipos de erosão, a heterogênea (superfície) e a homogênea (massa). O sistema de erosão por superfície é mais rápido do que a quantidade de água que é embebida na massa do polímero. Logo, a degradação acontece nas camadas mais superficiais do polímero, afetando assim somente a superfície do polímero e não a parte interna (FAISANT et al, 2002). Já na erosão de massa, a quantidade de água embebida no sistema é mais rápida do que a degradação da massa do polímero, assim o sistema é umedecido e ocorre a quebra de cadeias do polímero por todo o dispositivo (FAISANT et al, 2002).

Ainda é sabido que o PLGA pode sofrer degradação hidrolítica via erosão da parte volumosa, o que leva à formação de água e dióxido de carbono através do intermediário de ácido láctico e monômero de ácido glicólico (JAIN et al, 2010). As propriedades físico-químicas dependem do peso molecular, viscosidade inerente e resistência mecânica que vai influenciar e controlar a taxa de biodegradação do polímero e hidrólise (ARAÚJO et al, 2009).

Esse polímero tem atraído considerável atenção devido às suas propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade (DANHIER et al., 2012). A hidrólise do PLGA (Figura 8) leva à formação de ácido láctico e ácido glicólico, sendo que esses produtos são metabolizados facilmente no ciclo de Krebs, tendo assim uma baixa toxicidade (DANHIER et al., 2012).

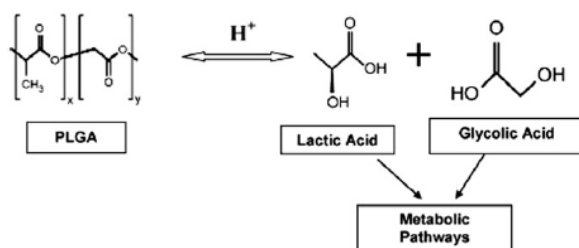


Figura 8: Hidrólise do PLGA. (Danhier et al, 2012)

As nanopartículas de PLGA, quando administradas sistemicamente, adentram á célula por meio de pinocitose e também por endocitose mediada por clatrina (DANHIER et al, 2012).

A técnica mais comum utilizada para a preparação de nanopartículas de PLGA é a técnica de evaporação de emulsão-solvente. Ela permite encapsular fármacos hidrofóbicos e consiste em dissolver o polímero e o composto num solvente orgânico volátil. A emulsão de óleo em água (O/A) é preparada adicionando-se água e um agente tensoativo à solução de polímero (fase oleosa). Em seguida, por meio de técnicas energéticas (sonicação) ou de alta rotação (turrax) ou homogeneização (homogenizador de alta pressão) é possível induzir a formação gotículas nanométricas. O solvente é então evaporado ou extraído e as nanopartículas formadas por precipitação do polímero e são recolhidas após centrifugação (DANHIER et al, 2012). A dupla emulsificação A/O/A é uma forma modificada dessa técnica e foi utilizada para encapsular fármacos hidrofílicos, como peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos. As nanopartículas também podem ser formadas pelo método de nanoprecipitação, chamado também de método de deposição interfacial. Resumidamente, o polímero e o fármaco são dissolvidos num solvente orgânico, como acetona, e logo após se adiciona água lentamente ao sistema. O solvente orgânico é evaporado e as nanopartículas são recolhidas após centrifugação. Existem ainda outras técnicas, a exemplo do método de secagem por pulverização (DANHIER et al, 2012)..

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A OXP (99% de pureza) foi obtida da Simagchem (Xiamen, China) e PLGA (detalhar melhor qual o PLGA) foi obtido da Purac (Holanda). Diclorometano (DCM) e Polissorbato 80, utilizados no preparo da nanopartículas, foram obtidos da Dinâmica Química (São Paulo, Brasil). A membrana de acetato de celulose (PM 12000 a 4000 Da), usada nos testes *in vitro* de liberação, foi obtida da Fisherbrand (Leicestershire, UK). A solução receptora utilizada foi um tampão, pH 7,4, preparado com o sal HEPES (J.T.Baker, Estados Unidos). Todas as análises e preparações foram realizadas com água Milli-Q (Millipore, França).

4.2 Método analítico

O método analítico utilizado para analisar a OXP foi desenvolvido e validado pelo grupo de pesquisa seguindo os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação (MATOS et al, 2016). De maneira resumida, a OXP foi dosada com o auxílio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu LC 20-AD, Kyoto Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS) ,acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm) de Dionex Co. (Salt Lake City, UT, USA). A fase móvel foi composta por uma mistura de solução aquosa ácida (0,01 M ácido fosfórico) : acetonitrila (95:5) (v/v). A vazão foi de 1 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 20 µL, o forno foi utilizado à temperatura ambiente (25° C) e a detecção UV foi feita em 255 nm.

4.3 Obtenção das nanopartículas

As nanopartículas de PLGA encapsulando a OXP (Nano-OXP) foram preparadas a partir da técnica de dupla emulsificação e evaporação do solvente (COHEN-SELA et al, 2009). Resumidamente, 1 mL de uma solução aquosa de OXP, de concentração 2727,27 µ/mL contendo 4% (m/v) de polissorbato 80 foi vertida sobre 3 mL de uma solução contendo 3% de PLGA dissolvido em diclorometano (DCM) e emulsificada com a ajuda de uma sonda

de ultrassom (Sonics, Estados Unidos), que operou por 3 min a uma amplitude de 50%. A emulsão obtida foi então vertida sobre uma solução aquosa contendo 30% (m/v) de polissorbato 80 sob agitação utilizando novamente a sonda de ultrassom sob os mesmo parâmetros. Após, o sistema obtido foi evaporado em rotaevaporador (Heidolph, Alemanha) que operou a uma rotação de 80 rpm a 40° C, para garantir a completa eliminação do solvente orgânico. Na tentativa de melhorar a encapsulação do fármaco, experimentos foram realizados adicionando-se cloreto de cálcio na fase aquosa interna da dupla emulsão na proporção de 2:1 (m/m) em relação à OXP.

As quantidades OXP adicionadas variaram nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1 (m/m) em relação ao polímero PLGA.

4.4 Caracterização das nanopartículas

O diâmetro hidrodinâmico das partículas, o PDI e o potencial zeta foram analisados por espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética, respectivamente, utilizando-se um aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK). Para a análise, 1 mL das nanopartículas foram colocadas na cubeta e levadas ao equipamento.

4.5 Morfologia

A morfologia foi analisada em microscópio eletrônico de varredura (MEV), em que feixe de elétrons emitidos no vácuo pelo equipamento possibilitam a visualização das nanopartículas. Para a análise, 10 µL das amostra de nanopartícula contendo o OXP foram colocados em um suporte e deixados a temperatura ambiente até que o solvente evaporasse. Em seguida, a amostra foi metalizada com ouro e levada ao equipamento para análise. As fotomicrografias foram capturadas em aumentos de 4.000 x.

4.6 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada de maneira indireta avaliando-se a quantidade de fármaco no meio em que as partículas foram suspensas. Dessa forma, uma alíquota das Nano-OXP dispersas em água foi centrifugadas a 6.000 rpm por 15 minutos em uma centrífuga Nova Ética (Brasil). O sobrenadante separado e filtrado em um filtro de porosidade de 0,45 µm. Foi realizada uma diluição de 1:100 do filtrado em água e o

doseamento da OXP foi realizado por um método previamente padronizado. A EE% foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$EE\% = [(C_{\text{teórico}} - C_{\text{obtido}}) / C_{\text{teórico}}] \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

onde: C_{obtido} é a concentração de OXP dosada no sobrenante; e $C_{\text{teórico}}$ é a concentração de OXP que foi inicialmente colocada para o preparo das nanopartículas.

4.7 Liberação da OXP a partir das Nano-OXP

Para determinação da cinética de liberação da OXP a partir das Nano-OXP, células de difusão do tipo Franz foram montadas com uma membrana sintética de acetato de celulose separando os compartimentos doadores dos receptores (Figura 9).



Figura 9: Célula de difusão do tipo Franz montada para a realização da liberação.

O compartimento receptor, na metade inferior da célula, foi preenchido com 15 mL de uma solução tampão HEPES, pH 7,4 e essa solução foi mantida sob agitação de 300 rpm a 34° C por um período de 12 h. No compartimento doador, sobre a membrana, foi colocado 1 mL das suspensões de Nano-OXP (contendo o equivalente a 2,72 mg/mL de OXP, pH 5,0). A cada hora, uma amostra de 1 mL da solução receptora foi coletada para doseamento do fármaco liberado. Experimentos semelhantes foram realizados colocando-se no compartimento doador 1 mL da solução aquosa do fármaco (2727,2 µg/mL e pH 5,0).

A quantidade de fármaco liberada foi analisada por CLAE-UV. O perfil de liberação foi obtido plotando-se um gráfico de quantidade de OXP permeado *versus* tempo, e foi comparado ao perfil de difusão do OXP livre (controle).

4.8 Análise dos dados

Os dados estão apresentados em tabelas e figuras como média e desvio padrão da média de pelo menos 3 replicatas. A análise estatística foi feita com a utilização do programa Graphpad Prism.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de dupla emulsificação para obtenção de Nano-PLGA foi escolhida considerando-se a baixa solubilidade aquosa do polímero PLGA e a alta solubilidade aquosa do fármaco OXP (aproximadamente 8 g/L) (DAHAN et al., 2009). A dupla emulsificação é uma modificação da técnica de simples emulsificação, que é utilizada para encapsulação de fármacos lipossolúveis em PLGA. Uma das desvantagens da técnica de dupla emulsificação, no entanto, é a perda de fármaco inicialmente colocado na fase aquosa interna para a fase aquosa externa da emulsão múltipla preparada. Desta forma, foram testadas diferentes proporções fármaco/polímero (m/m) e avaliadas as EE% obtidas. Os resultados estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de diâmetro médio, PDI e eficiência de encapsulação (EE%) obtidos para Nano-OXP preparados com diferentes proporções polímero/fármaco (m/m), sem a adição de cloreto de cálcio.

Polímero/fármaco	Diâmetro (nm)	PDI	EE (%)
1:1	615,1	1,000	-
1:2	44,2	0,321	-
1:3	260,9	0,260	14,73

Verifica-se que praticamente não se conseguiu encapsular o fármaco nas nanopartículas de PLGA, independente da proporção fármaco/polímero testada. COHEN-SELA et al. (2009) também obtiveram uma baixa taxa de encapsulação em seus experimentos utilizando o mesmo método e polímero para encapsulação de fármacos hidrofílicos.

Para tentar solucionar o problema e se obter uma EE% maior, utilizou-se uma nova metodologia adicionando-se cloreto de cálcio, pois sabe-se que o íon Ca^{2+} serve de contra-íon para o fármaco, reduzindo a sua solubilidade aquosa e, portanto, mantendo-o em contato com o PLGA que possui característica hidrofóbica (COHEN-SELA et al., 2009). A proporção polímero/fármaco testada foi fixada em 1:3 (m/m), uma vez que foi a única proporção em que se formou partículas com tamanho adequado e em que se obteve alguma encapsulação do fármaco nos experimentos iniciais (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta os resultados de caracterização das partículas após a adição do cloreto de cálcio na emulsão inicial.

Tabela 2: Diâmetro hidrodinâmico, PDI, potencial zeta e EE% das Nano-OXP e nas Nano-PLGA (controle) preparadas com a adição de cloreto de cálcio.

Amostra	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	EE (%)
Nano-PLGA (controle)	490,1 ± 153,11	0,305 ± 0,17	- 2,96 ± 0,05	-
Nano-OXP	696,6 ± 289,1	0,395 ± 0,15	-2,00 ± 0,04	60,64% ± 0,15

Observa-se que a utilização de cloreto de cálcio aumentou a EE% em aproximadamente quatro vezes. A presença do contra-íon Ca^{2+} de fato deve ter reduzido a polaridade do fármaco, que interagiu melhor com o PLGA.

Houve diferença ($p > 0,05$) no diâmetro da partícula formada na presença do fármaco em comparação à mesma partícula sem o fármaco. Isso era esperado, uma vez que Chittasupho *et al* (2014) também verificaram que a encapsulação do fármaco aumentou o tamanho de suas partículas em comparação à mesma partícula vazia.

As nanopartículas tiveram PDI satisfatório ($\text{PDI} < 1,000$). Isso demonstra que o tamanho das nanopartículas variou em torno do valor médio de maneira satisfatória.

Quanto ao potencial zeta, as partículas tiveram leve carga negativa mas tenderam à neutralidade. Isso porque o PLGA possui grupamentos carboxila, mas a adição de cloreto de cálcio deve ter neutralizado esses grupamentos (WANG et al, 2014).

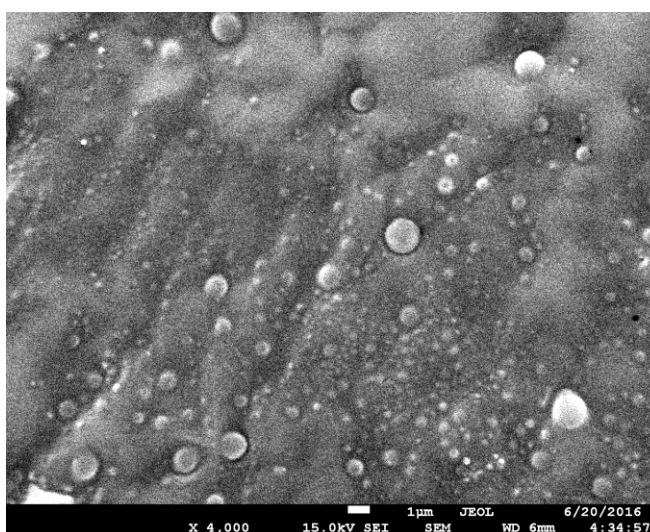


Figura 10: Fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura no aumento de 4.000x.

A Figura 10 mostra a fotomicrografia das Nano- PLGA. As partículas apresentaram-se esféricas, assim como aquelas preparadas anteriormente por Gupta *et al* (2014) e Khuroo *et al* (2014).

Os estudos de liberação foram realizados *in vitro* a fim de se avaliar a velocidade com que o fármaco é liberado pela formulação. Sabe-se que as nanopartículas de PLGA, além de melhorar a estabilidade de fármacos, costumam retardar sua liberação, dando origem a medicamentos de liberação controlada (JAIN *et al.*, 2010). Nesse trabalho, as formulações contendo Nano-OXP e solução controle de OXP livre foram colocadas em contato com uma membrana de acetato de celulose que separava as formulações da solução receptora. A Figura 11 mostra as porcentagens de OXP liberadas das Nano-OXP, contendo 2,727 mg/mL, pH 5,0 em função do tempo em comparação à solução controle, que continha a mesma concentração de fármaco e mesmo pH.

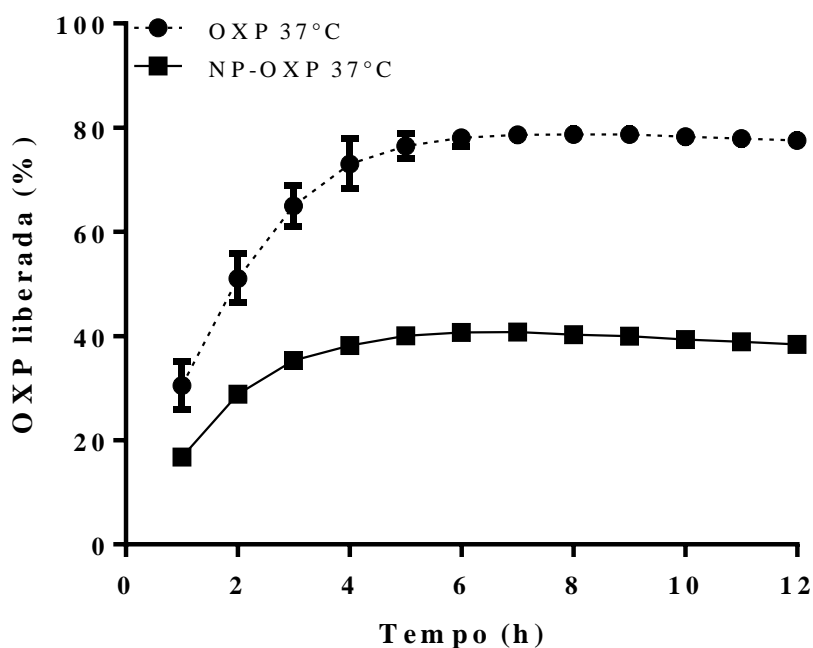


Figura 11: Perfil de liberação da OXP a partir das Nano-OXP em comparação à difusão do fármaco dissolvido em água, utilizado como controle.

A solução de OXP livre demorou aproximadamente 5 h para se difundir através da membrana de celulose. Já o fármaco encapsulado em Nano-OXP teve sua liberação bastante reduzida, sendo a partir da quinta hora quando a formulação começa a controlar a liberação. Esse efeito “burst” na liberação inicial do fármaco é típico de nano e micropartículas preparadas com PLGA. Lagarce *et al* (2002) desenvolveram micropartículas de PLGA

encapsulando a OXP e também observaram que elas foram capazes de controlar a liberação do fármaco no período de 12 horas. Cohen-Sela *et al* (2009) mostraram que a liberação de um fármaco hidrofílico a partir de nanopartículas de PLGA também foi sustentado.

6 CONCLUSÕES

As nanopartículas de PLGA contendo OXP e preparadas com cloreto de cálcio apresentaram diâmetro inferior a 700 nm e EE% superior a 60%. As partículas foram capazes de controlar a liberação do fármaco, mostrando-se um sistema farmacêutico interessante para ser adicionado a formulações bioadesivas para a terapia tópica de tumores de mucosa oral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affonsoa, V. R., Montoroa, J. R. M. C, Freitasb, L. C.C., Saggioroc, F. P., Souzae, L., Mamedeb,R. C. M. **Peritumoral infiltrate in the prognosis of epidermoid carcinoma of the oral cavity**. Braz J Otorhinolaryngol. 2015;**81(4)**:416-421.

Ausoni, S., Boscolo-Rizzo, P., Singh, B., Mosto, M. C, Spinato, G. Tirelli, G., Spinato, R. Azzarello, G. **Targeting cellular and molecular drivers of head and neck squamous cell carcinoma: current options and emerging perspectives**. Cancer Metastasis Rev DOI 10.1007/s10555-016-9625-1.

Benson, R., Mallick, S., Julka, P.K., Rath G.K. **Anti EGFR therapy in the treatment of non-metastatic head and neck squamous cell carcinoma: The current evidence**.

Brocklehurst, P., Kujan, O., O'Malley, L.A., Ogden, G., Shepherd, S., Glenny, A.M. **Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer**. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Nov 19;11:CD004150.

Brunton, L. L., Chabner, B. A., Knollmann, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12ª edição. Porto Alegre: AMGH. 2012. 2080p.

Bunget, A. Fronie, Afrem, E., Puşcu, D. C., Manolea, H., Dan, A. R., Coman, M. Nimigean, V. R. **Microscopic aspects of angiogenesis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma**. *Rom J Morphol Embryol* 2013, 54(3):623–627.

Bussmann, L., Busch, C. J., Löwincz, B. B., Rieckmann, T., Block, A. Knecht, R.. **Perspectives in chemosensitivity and chemoresistance assays and their implementation in head and neck câncer**. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2016. DOI 10.1007/s00405-015-3893-1

Chang, P. MH, Teng,HW, Chen, PM, Chang, SY, Chu, PY, Tsai, TL, Tai, SK, Wang, YF, Huang, JL, Yang, MH. **Methotrexate and Leucovorin Double-modulated 5-Fluorouracil**

Combined with Cisplatin (MPFL) in Metastatic/Recurrent Head and Neck Cancer. J Chin Med Assoc. 2008 Jul;71(7):336-41.

Chittasupho,C., Lirdprapamongkol, K., Prartana Kewsuwan, P., Sarisuta, N. **Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles.** Eur. J. Pharm. Biopharm (2014).

Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H. D., Golomb, G. **A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles.** Journal of Controlled Release 133, 2009, 90–95.

Dahan A., Miller J.M., Gordon L., Amidon. **Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs.** AAPS J. 11, 2009, 740–746.

Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. **PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications.** J Control Release, 2012, 161(2):505-22.

Espinosa, M., Martinez, M., Aguilar, J. L., Mota, A., De la Garza, J. G., Maldonado, V., Zajgla, J. M. **Oxaliplatin activity in head and neck cancer cell line.** Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 55: 301–305.

Fernandes, G. M., Bergmann, A., Oliveira, J. F. **An lise epidemiol gica de popula o com c ncer de cabe a e pesco o: influ ncia sobre as complica es p s operat rias.** Rev. Bras. Cir. Cabe a Pesco o, 2013, v.42, n  3, p. 140-149.

Gr be, A., Rybak, L., Sch n, G., Smeets, R., Tribius, S., Schafhausen, P., Clauditz, T. S., Hanken, H., Heiland, M. **Outcome and fewer indications for adjuvant therapy for patients with oral squamous cell carcinomas under standardized tumor board conditions.** J Cancer Res Clin Oncol DOI 10.1007/s00432-015-2058-3.

Gupta, P.N., Jain, S., Nehate, C., Alam, N., Khare, V., Dubey, R.D., Saneja, A., Kour, S., Singh, S.K. **Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA: poloxamerblend nanoparticles for câncer.** Int J Biol Macromol. 2014 Aug;69:393-9.

Hu, Z., Qian, G., Müller, S., Xu, J., Saba, N. F., Kim, S., Chen, Z., Jiang, N., Wang, D., Zhang, H., Lane, K., Hoyt, C., Shin, D. M. Chen, Z. G. **Biomarker quantification by multiplexed quantum dot technology for predicting lymph node metastasis and prognosis in head and neck câncer.**

Jain, G. K.; Pathan, S. A.; Akhter, S.; Ahmad, N.; Jain, N.; Talegaonkar, S.; Khar, R. K.; Ahmad, F. J. **Mechanistic study of hydrolytic erosion and drug release behaviour of PLGA nanoparticles: Influence of chitosan.** Polymer Degrad. Stabil. 2010, 95, 2360–2366.

Kano, M.R. **Nanotechnology and tumor microcirculation.** Adv Drug Deliv Rev. 2014 Jul;74:2-11.

Khuroo, T., Verma, D., Talegaonkar, S., Padhi, S., Pand, A. K., Iqbal, K. **Topotecan–tamoxifen duple PLGA polymeric nanoparticles: Investigation of in vitro, in vivo and cellular uptake potential.** International Journal of Pharmaceutics 473, 2014, 384–394.

Lagarce, F., Cruaud, O., Deuschel, C., Bayssas, M., Griffon-Etienne, G., Benoit, J.P. **Oxaliplatin loaded PLAGA microspheres: design of specific release profiles.** International Journal of Pharmaceutics 242, 2002, 243–246

Lila, A. S. A., Kiwada, H., Ishida, T. **Selective Delivery of Oxaliplatin to Tumor Tissue by Nanocarrier System Enhances Overall Therapeutic Efficacy of the Encapsulated Oxaliplatin.** Biol Pharm Bull. 2014;37(2):206-11.

Luo, S.D., Chen, Y.J., Liu, C.T., Rau, K.M., Chen, Y.C., Tsai, H.T., Chen, C.H., Chiu, T.J. **Osteopontin Involves Cisplatin Resistance and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma.** Biomed Res Int. 2015;2015:508587.

Matos, B. N., Oliveira, P. M., Reis, T. A., Gratieri, T., Filho, M. C., Gelfuso, G. M. **Development and Validation of a Simple and Selective Analytical HPLC Method for the Quantification of Oxaliplatin.** Journal of Chemistry Volume, 2015, Article ID 812701, 6 pages.

Melchardt, T., Hufnagl, C., Magnes, T., Weiss, L., Hutarew, G., Neureiter, D., Schlattau, A., Moser, G., Gaggl, A., Tränkenschuh, W., Greil, R., Egle, A. **CYP39A1 polymorphism is associated with toxicity during intensive induction chemotherapy in patients with advanced head and neck cancer.** BMC Cancer, 2015, 15:725.

Mirza, S., Fadl, S., Napaki, S., Abualruz, A. R. **Case report of complicated epidermoid cyst of the floor of the mouth: Radiologyhistopathology correlation.** Qatar Med J. 2014 Jun 16;2014(1):12-6.

Motta A.C., Duek E.A.R. **Síntese, Caracterização e Degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico).** Revista Matéria, 2006, v. 11, n. 3, pp. 340 – 350.

Moura, L. K. B., Marcaccini, A. M., Matos, F. T. C., Sousa, A. F. L. Nascimento, G. C., Moura, M. E. B. **Revisão integrativa sobre o câncer bucal.** J. res.: fundam. care. online 2014. dez. 6(supl.):164-175.

Osazuwa-Peters, N., Massa, S.T., Christopher, K.M., Walker, R.J., Varvares, M.A. **Race and sex disparities in long-term survival of oraland oropharyngeal cancer in the United States.** J Cancer Res Clin Oncol. 2015 Oct 28.

Perego, P., Robert, J. **Oxaliplatin in the era of personalized medicine: from mechanistic studies to clinical efficacy.** Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 77:5–18.

Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. L., Pohlmann, A. R. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Quim. Nova, 2003, Vol. 26, No. 5, 726-737.

Souza et al. **Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles.** Eur J Med Chem. 2015; 95:267-276.

Rahal, A. K., Truong, P. V., Kallail, K.J. **Oxaliplatin-Induced Tonic-Clonic Seizures.** Case Rep Oncol Med. 2015;2015:879217.

Tank, P. W., Gest, T. R. **Atlas de anatomia humana.** Tradução Alexandre Lins Werneck – Porto Alegre: Artmed, 2009. 448 p.: il; 28cm

van der Meel R, Vehmeijer LJ, Kok RJ, Storm G, van Gaal EV. **Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: Current status.** Adv Drug Deliv Rev. 2013 Oct;65(10):1284-98.

Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E. Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H. R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., Hitt, R. **Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer.** N Engl J Med 2008;359:1116-27.

Wang, H., Zhao, Y., Wang, H., Gong, J., He, H., Shine, M. C., Yang, V. C., Huang, Y. **Low-molecular-weight protamine-modified PLGA nanoparticles for overcoming drug-resistant breast cancer.** Journal of Controlled Release 192, 2014, 47–56.

Yang, K., Zhao, N., Zhao, D., Chen, D., Li, Y. **The drug efficacy and adverse reactions in a mouse model of oral squamous cell carcinoma treated with oxaliplatin at different time points during a day.** Drug Des Devel Ther. 2013 Jun 20;7:511-7.

Zhang, L., Wang, C. Q., Liu, F., Dong, Z. Q., Zhao, P., Dong, X. N., Wei, F., Qu, X., Xiang, F. G. **Effects of human Dachshund homolog 1 on the proliferation, migration, and adhesion of squamous cell carcinoma of the tongue.** Grants from National Natural Science. Volume 121, Number 1.