

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO DA OXALIPLATINA NA MUCOSA  
ORAL A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Orientanda: Camila Oliveira Cardoso – 13/0007188

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientador: Prof. Mestre Breno Noronha Matos

Brasília - DF

2017

CAMILA OLIVEIRA CARDOSO

AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO DA OXALIPLATINA NA MUCOSA  
ORAL A PARTIR DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Monografia apresentada ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito parcial de obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientador: MsC. Breno Noronha Matos

Brasília - DF

2017

Dedico aos meus pais, Eldeberto e Vilma; à  
minha irmã, Larissa; aos meus avós, Valentim  
e Alzira e, em memória dos meus avós, Olavo  
e Josina

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Oliveira Cardoso

**Avaliação da penetração da oxaliplatina na mucosa oral a partir de nanopartículas de quitosana**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.



---

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

Universidade de Brasília

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me confortar e acalmar nos momentos de tribulações e à Nossa Senhora por toda intercessão.

Aos meus pais, Eldeberto e Vilma, por todo apoio, suporte, paciência e incentivo que sempre me deram, por sempre priorizarem minha educação e por serem os modelos que sempre irei me espelhar.

À minha querida e amada irmã, Larissa, por ser um exemplo e inspiração. Pela sua paciência e incentivo, pelos momentos de distração e calma que me transmitiu durante essa jornada.

Aos meus amados avós, Valentim e Alzira, por todo amor, carinho e cuidado, e pelo exemplo de vida que me deram. E aos meus avós paternos, Olavo e Josina, que já partiram dessa vida e ainda assim me iluminam de longe.

Aos meus tios, por todo apoio durante essa etapa. E aos meus primos, em especial Felipe, Fernanda e Samara, pelos momentos de descontração e por todo o carinho.

Aos meus colegas de curso, que me acompanharam durante essa caminhada, em especial a Heidi e Mariana, que estiveram comigo em todos os momentos, bons e ruins, alegres e tristes, e sempre foram meu apoio, e a Dominique pelos momentos de brincadeiras e alegria, e por estar sempre por perto.

Aos meus amigos, Aléxia e Arthur, pelo carinho, pelas horas de descontração e por todo incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Gelfuso, pela paciência, apoio, orientação e disposição.

Ao meu co-orientador, MsC. Breno Matos, por todo o incentivo, pelas correções e auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda em alguns experimentos e, principalmente, a Maíra Nunes, pelas correções e ajuda no projeto.

Aos meus prezados professores do curso, que acompanharam minha jornada e contribuíram para o meu crescimento profissional.

## RESUMO

CARDOSO, C. O. Avaliação da penetração da oxaliplatina na mucosa oral a partir de nanopartículas de quitosana. Brasília, 2017. Monografia (Bacharelado em Farmácia). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Carcinoma de cabeça e pescoço ocupa uma alta posição na lista das neoplasias mais frequentes no mundo. Dentre as principais opções de tratamento para pacientes com câncer de cabeça e pescoço estão a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. A quimioterapia é cada vez mais incorporada a protocolos de tratamento, mesmo com as altas taxas de reações adversas, o que representa um fator limitante para o seu sucesso. Com o objetivo de reduzir o efeito sistêmico da oxaliplatina (OXP), um composto de platina usado em uma série de regimes de tratamento de câncer, esse trabalho propõe o preparo de nanopartículas de quitosana, encapsulando OXP, com propriedades mucoadesivas. E também, propõe o uso da técnica de iontoforese para aumento da liberação do fármaco na mucosa oral. As nanopartículas de quitosana encapsulando a oxaliplatina (Nano-OXP) foram preparadas a partir da técnica de gelificação ionotrópica. As Nano-OXP foram caracterizadas pelo seu tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação. As Nano-OXP obtidas apresentaram um tamanho médio de  $283,2 \pm 74,5$  nm, PDI  $0,368 \pm 0,0280$ , potencial zeta  $+40,8 \pm 2,6$  mV e uma eficiência de encapsulação de  $98,9 \pm 0,03$  %. As nanopartículas de quitosana apresentaram estabilidade física durante 60 dias, tanto a temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ , quanto a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . A permeação do fármaco foi determinada *in vitro* utilizando células de difusão tipo “Franz” montadas com mucosa suína, o experimento foi realizado por um período de 2h de forma passiva e de 2h sob a aplicação de uma corrente elétrica fraca (iontoforese), em que foi possível observar o aumento da transferência de substâncias quando aplicada a iontoforese.

**Palavras-chave:** carcinoma de cabeça e pescoço, nanopartículas, quitosana, mucoadesão, iontoforese.

## ABSTRACT

Head and neck cancer occupies a high position in the list of the most frequent neoplasias in the world. Among the main treatment options for patients with head and neck cancer, there is surgery, radiotherapy and chemotherapy. Chemotherapy is increasingly incorporated into treatment protocols, even with high rates of adverse reactions, which is a limiting factor for its success. In order to reduce the systemic effect of oxaliplatin (OXP), a platinum compound used in a series of regimens for cancer treatment, this research proposes preparing chitosan nanoparticles, encapsulating OXP, with mucoadhesive properties. It also proposes the use of the iontophoresis technique to increase the release of the drug into the oral mucosa. Chitosan nanoparticles encapsulating oxaliplatin (Nano-OXP) were prepared using the ionotropic gelation technique. Nano-OXP were characterized by their size, polydispersity index (PDI), zeta potential and encapsulation efficiency. Nano-OXP obtained had an average size of  $283,2 \pm 74,5$  nm, PDI  $0,368 \pm 0,0280$ , zeta potential  $+40,8 \pm 2,6$  mV and an encapsulation efficiency of  $98.9 \pm 0.03\%$ . The chitosan nanoparticles have exhibited physical stability for 60 days at both  $10^{\circ}\text{C}$  and  $25^{\circ}\text{C}$  temperatures. Drug permeation was determined *in vitro* using diffusion "Franz" cells mounted with porcine mucosa, the experiment was performed for a period of 2h passively and 2h under the application of a weak electric current (iontophoresis), in which it was possible to observe increase of the transfer of substances when applied iontophoresis.

**Keywords:** head and neck cancer, nanoparticles, chitosan, mucoadhesion, iontophoresis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estágios de desenvolvimento do câncer.....	5
<b>Figura 2.</b> Modelo da progressão genética em várias etapas do carcinoma oral.....	7
<b>Figura 3.</b> Estruturas anatômicas em que se pode originar o câncer de cabeça e pescoço.....	8
<b>Figura 4.</b> Atuação dos quimioterápicos sobre as células cancerosas e saudáveis. ....	11
<b>Figura 5.</b> Modo de ação da cisplatina no DNA.....	12
<b>Figura 6.</b> Estrutura química dos compostos de platina. ....	12
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de ação da OXP. ....	13
<b>Figura 8.</b> Formação de nanopartículas pela reticulação do polímero positivo pelo TPP negativo.....	17
<b>Figura 9.</b> Etapas do mecanismo de mucoadesão. ....	19
<b>Figura 10.</b> (A) Eletrorrepulsão: O eletrodo positivo repele fármacos de carga positiva, fazendo com que atravessem a mucosa. No eletrodo negativo, fármacos de cargas negativas são repelidos. (B) Eletrosmose: O fluxo de um solvente fisiológico promovido pela corrente elétrica entre os eletrodos positivo e negativo permite a transferência de fármacos neutros. ....	21
<b>Figura 11.</b> Mucosa bucal de suínos: (A) mucosa retirada do suíno após o abate do animal e antes do processo de escalda; (B) vista externa mucosa de suíno limpa.....	23
<b>Figura 12.</b> Célula de difusão do tipo Franz modificada para estudos <i>in vitro</i> de permeação (A) e montagem da célula de difusão tipo Franz com mucosa suína (B). ..	26
<b>Figura 13.</b> Célula de difusão do tipo Franz modificada para estudos <i>in vitro</i> de permeação sob agitação magnética em banho-maria. ....	26
<b>Figura 14.</b> Célula de difusão do tipo Franz modificada para estudos <i>in vitro</i> de permeação sob a influência de uma corrente elétrica fraca (iontoforese). ....	27
<b>Figura 15.</b> Nanopartícula de quitosana antes (A) e após (B) a adição da solução de TPP (1,50 mg/mL), em B a solução fica turva. ....	29

<b>Figura 16.</b> (A) Diâmetro hidrodinâmico e (B) PDI da dispersão de nanopartículas (nm) em função do tempo referente às replicatas armazenadas à temperatura de 10°C e 30 ± 5°C. ....	32
<b>Figura 17.</b> (A) Potencial zeta (mV) e (B) pH da dispersão de nanopartículas em função do tempo referente às replicatas armazenadas à temperatura de 10°C e 30 ± 5°C. ....	33
<b>Figura 18.</b> Quantidade de OXP recuperada das mucosas após 2h de aplicação passiva e após 2h de aplicação de uma corrente fraca (iontoforese) das formulações de Nano-OXP e de solução de OXP (controle).....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico médio (nm), potencial zeta (mV), PDI e EE (%) referentes às Nano-OXP e nanopartículas de quitosana sem o fármaco encapsulado (Nano controle). .....	30
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(v/v)	Volume/volume
CECP	Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Eficiência de encapsulação
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção melhoradas
HPV	Vírus do papiloma humano
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
Nano-OMP	Nanopartícula de quitosana encapsulando oxaliplatina
OMP	Oxaliplatina
PDI	Índice de polidispersão
RCF	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
TPP	Tripolifosfato de sódio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. OBJETIVO GERAL .....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	4
3.1. CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO .....	4
3.2. TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO .....	9
3.3. NANOMEDICINA E NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA .....	14
3.4. MUCOADESIVIDADE .....	17
3.5. IONTOFORESE .....	19
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1. MATERIAL .....	22
4.2. MUCOSA .....	22
4.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA OXP .....	23
4.4. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS .....	23
4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	24
4.6. ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS .....	25
4.7. PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> DA OXP A PARTIR DAS Nano-OXP .....	25
4.8. ANÁLISE DOS DADOS .....	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	29
5.2. ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS .....	31
5.3. PERMEAÇÃO <i>EX VIVO</i> DA OXP A PARTIR DAS Nano-OXP .....	34
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	38
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

Carcinomas de cabeça, incluindo os cânceres originários da cavidade oral, representam um dos tipos mais frequentes de câncer em todo o mundo (CHANG et al., 2008). Entre as principais opções de tratamento para pacientes com câncer de cabeça e pescoço estão a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a terapia alvo (INSTITUTO ONCOLOGIA, 2014). Embora seja cada vez mais incorporada a protocolos de tratamento, a quimioterapia sistêmica induz altas taxas de reações adversas, como fortes enjoos, problemas gastrointestinais, fraqueza, aumento de peso, feridas na boca, tonturas e queda de cabelo, e isso representa um fator limitante para o sucesso do tratamento (HERRERO; MEDARDE, 2015; IBCC, 2017).

Os compostos de platina como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (OXP) são agentes efetivos usados em uma série de regimes de tratamento para o câncer (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). A OXP é um quimioterápico que atua inibindo o crescimento tumoral por ligar-se ao material genético das células, impedindo sua multiplicação e proliferação (OXALIPLATINA, 2016).

Contudo, esses compostos induzem graves efeitos adversos como a neuropatia central e periférica; toxicidade gastrointestinal (STOJANOVSKA et al., 2017); citopenias (FORCELLO et al., 2015), como trombocitopenia (JARDIM et al., 2012); reações de hipersensibilidade (AROLDI et al., 2015); hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (OXALIPLATINA, 2016).

Nesse cenário, um sistema tópico tanto para o tratamento de primeira linha, como neoadjuvante seria altamente recomendado, pois deve reduzir os efeitos adversos sistêmicos associados aos compostos de platina.

A veiculação de quimioterápicos para tratamento tópico de tumores orais, no entanto, requer o uso de uma formulação que se mantenha em contato com a mucosa oral por um período prolongado, dando oportunidade para que altas concentrações do fármaco penetrem no tecido e atinjam a região tumoral. Nesse sentido, devido às suas

potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento, além da possibilidade de ser um sistema mucoadesivo, as nanopartículas constituídas por polímeros biodegradáveis revela-se como um sistema promissor para incorporação de derivados de platina e aplicação tópica (SHCAFFAZICK et al., 2003).

Este estudo, portanto, propôs o preparo e caracterização de nanopartículas de quitosana encapsulando a oxaliplatina (Nano-OXP), que devem apresentar características mucoadesivas conferidas por esse polímero catiônico, além de propor a avaliação da penetração do quimioterápico na mucosa oral de modo a testar sua viabilidade como alternativa no tratamento de tumores bucais. Além da penetração do fármaco a partir da formulação aplicada passivamente sobre a mucosa, também foi avaliado o potencial da iontoforese em favorecer o acúmulo do fármaco na mucosa a partir do sistema desenvolvido.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo preparar e caracterizar Nano-OXP com características mucoadesivas e avaliação da penetração do quimioterápico na mucosa oral, tanto com a aplicação passiva, quanto iontoforética da formulação, de modo a testar esta proposta como alternativa no tratamento de tumores orais.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter nanopartículas de quitosana encapsulando a OXP;
- Caracterizar nanopartículas quanto ao diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (mV) e eficiência de encapsulação (EE);
- Avaliar a estabilidade das suspensões das nanopartículas;
- Avaliar a permeação *ex vivo* da OXP na mucosa oral a partir das nanopartículas, tanto com aplicação passiva, quanto iontoforética.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO

Câncer decorre do crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, e são capazes de se espalhar pelo corpo, ou seja, sofrer metástase. Estas células que se dividem rapidamente tendem a ser muito agressivas, originando a formação de tumores ou neoplasias malignas. O câncer que apresenta início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, é denominado carcinoma (SARKAR et al., 2013; INCA, 2016).

O processo de carcinogênese é um processo lento que apresenta vários estágios (Figura 1), podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e origine um tumor. O primeiro estágio é denominado estágio de iniciação, este ocorre quando as células são expostas à agentes cancerígenos que provocam modificações em alguns de seus genes (RUNDHAUG; FISCHER, 2010). Quando essas alterações genéticas determinam a ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores, as células têm sua replicação e seu ritmo de crescimento alterados (BUNGET et al., 2013).

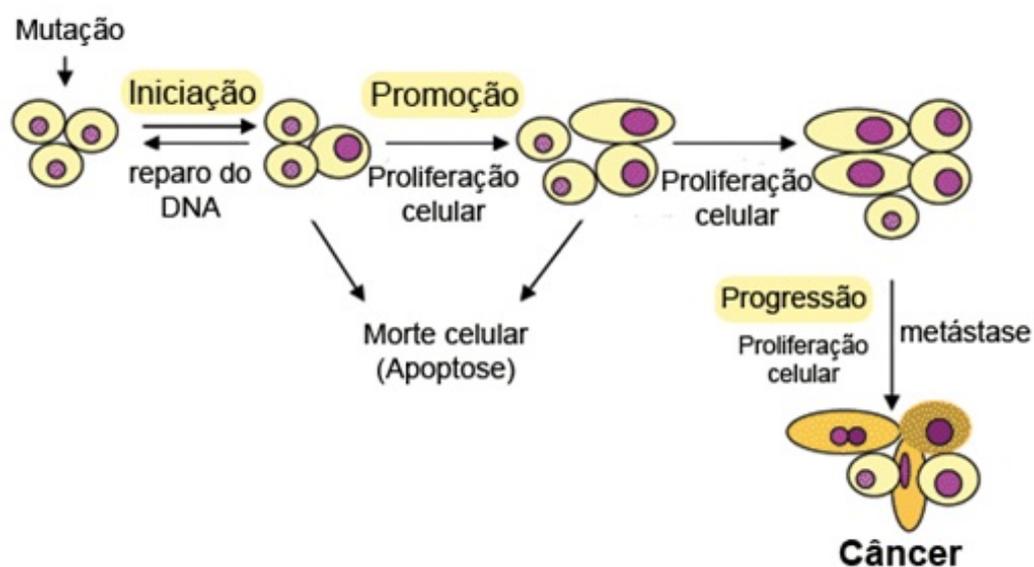
Proto-oncogenes são genes que normalmente auxiliam o crescimento celular, quando sofrem mutações ou existem muitas cópias, esses genes podem ficar permanentemente ativados, nesse estado, são conhecidos como oncogenes. Os oncogenes fazem com que a célula cresça indeterminadamente, podendo levar ao câncer (RANG et al., 2012; INSTITUTO ONCOGUIA, 2017). Alguns dos mecanismos comuns de ativação de oncogenes incluem: mutações, translocações cromossômicas, amplificação gênica e inserção retroviral (CHOI; MYERS, 2008).

Já os genes supressores de tumores são genes normais que retardam a divisão celular, reparam erros do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou induzem a apoptose. Quando os genes supressores do tumor não funcionam corretamente, as células podem

se desenvolver descontroladamente, ocasionando o câncer (RANG et al., 2012; INSTITUTO ONCOGUIA, 2017).

Após o estágio de iniciação, ocorre o estágio de promoção, quando a célula iniciada é transformada em célula maligna devido a um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. Esse estágio da carcinogênese é reversível, ou seja, o processo é interrompido se cessar o contato entre a célula e o agente promotor (SIDDIQUI et al., 2015).

O último estágio é o de progressão, esse se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, nessa etapa o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (INCA, 2016).



**Figura 1.** Estágios de desenvolvimento do câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

O câncer de cabeça e pescoço ocupa a quinta posição na lista das neoplasias mais frequentes, com uma incidência mundial estimada de 780.000 novos casos por ano (LEMAIRE et al., 2003; COLOMBO et al., 2009). A maioria dos cânceres de cabeça e pescoço tem início nas células escamosas que revestem as superfícies úmidas da região. Os sintomas mais comuns dos tumores de cabeça e pescoço incluem aparecimento de

nódulos, úlceras na mucosa que não cicatrizam, dor de garganta constante, alteração ou rouquidão na voz, disfagia, tosse crônica, otalgia referida e massas na região cerviceca (INSTITUTO ONCOGUAIA, 2014; CONITEC, 2015).

Esse carcinoma de células escamosas oral resulta de múltiplos eventos moleculares que se desenvolvem tanto por influência de predisposições genéticas, quanto pela exposição à carcinógenos (CALIFANO et al., 1996; KUMAR et al., 2016).

Dentre os fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço estão: o tabagismo, o consumo de álcool e a infecção com o vírus do papiloma humano (HPV) (INSTITUTO ONCOGUAIA, 2014; CONITEC, 2015). Segundo Gröbe (2016), o gênero também é um fator considerado de risco para esse câncer, devido a maior incidência câncer de boca e pescoço em pessoas do sexo masculino do que do sexo feminino.

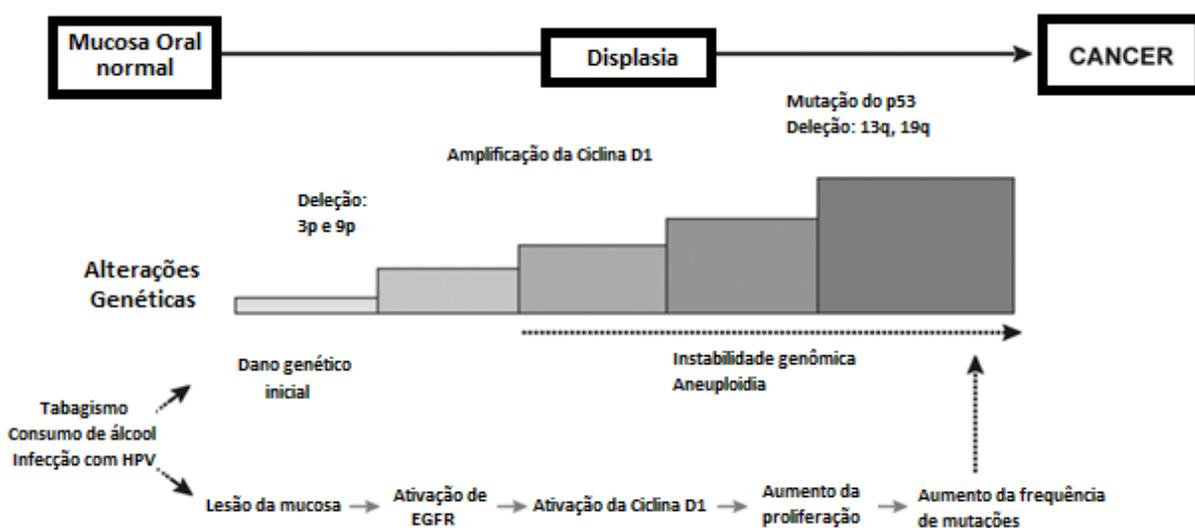
O tabagismo é um fator de risco que está diretamente relacionado à intensidade e duração do hábito de fumar (HASHIBE et al, 2007). O cigarro contém elementos carcinogênicos genotóxicos capazes de alterar o perfil molecular dos indivíduos e gerar mutações. O álcool, por sua vez, age como solvente aumentando a exposição da mucosa a agentes carcinogênicos, e seu metabólito acetaldeído pode formar adutos de DNA que interferem na síntese e no reparo do material genético (GALBIATTI et al., 2013).

Já o HPV é um vírus que pertence a uma família de vírus de DNA capazes de infectar as células epiteliais basais, provocando lesões benignas e malignas na pele e na mucosa do trato anogenital e aero-digestivo superior (MARTEL et al, 2017), essas lesões ocorrem, principalmente, quando as infecções são causadas pelos tipos 16 e 18 do vírus (MANNARINI et al., 2009). Cerca de 38.000 casos de câncer de cabeça e pescoço são atribuídos ao HPV e, aproximadamente, 30% dos cânceres de orofaringe são causados por este vírus. A fração de câncer orofaríngeo relacionada ao HPV tem aumentado nas últimas duas décadas concomitante ao declínio do tabagismo e aumento da infecção pelo vírus (MARTEL et al, 2017).

A exposição crônica aos carcinógenos mencionados, tabaco, álcool e HPV, pode danificar tanto genes individuais, como largas porções do material genético, incluindo

cromossomos. O acúmulo dessas alterações genéticas, representado na figura 2, resulta nas primeiras lesões e subsequentemente em um carcinoma invasivo (CHOI; MYERS, 2008).

Os estudos citogenéticos moleculares têm evidenciado várias regiões cromossômicas consistentemente alteradas em tumores de cabeça e pescoço, envolvendo ganhos em 3q, 5p, 7q, 8q, 9q, 11q13 e 20q e perdas em 3p, 5q, 8p, 9p, 13q, 18q, 21q. Outros estudos citogenéticos e moleculares investigaram a ocorrência de alterações genéticas nesses tumores, demonstrando que ativação de oncogenes, como: ciclina D1, *H-ras*, *c-myc*, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR); e inativação de genes supressores de tumor, como: P16, TP53, P21 estão envolvidas no desenvolvimento da doença (COLOMBO e RAHAL, 2009).



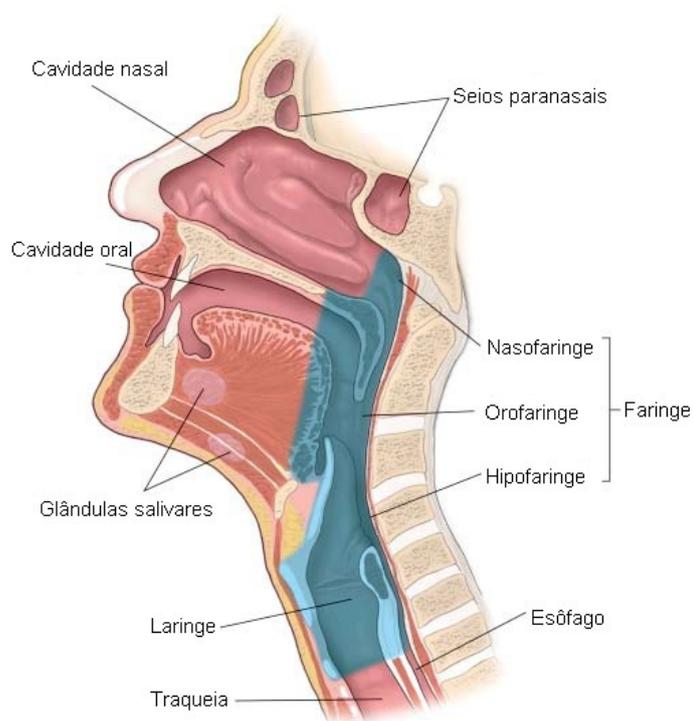
**Figura 2.** Modelo da progressão genética em várias etapas do carcinoma oral (adaptado de CHOI; MYERS, 2008).

Os oncogenes mencionados podem ser categorizados em grupos funcionais, dentre eles estão os fatores de crescimento ou receptores de fator de crescimento, como EGFR; os transdutores de sinais intracelulares, como *H-ras* e *raf*; os fatores de

transcrição, como *c-myc*; os reguladores do ciclo celular, como ciclina D1 e os envolvidos na inibição da apoptose, como bcl-2 (CHOI; MYERS, 2008).

Os genes supressores de tumor são genes que codificam proteínas que regulam de forma negativa o crescimento celular, direcionando a parada do ciclo e a apoptose. Se desativados, as células escapam do controle do ciclo e, assim, passam a se dividir de forma descontrolada, levando ao fenótipo maligno, como ocorre com o gene TP53, localizado em 17p13 (COLOMBO; RAHAL, 2009).

Todas essas alterações citadas que decorrem da exposição à carcinógenos ou mesmo da predisposição genética podem resultar no câncer de cabeça e pescoço, que compreende as regiões: cavidade oral, faringe, laringe, glândulas salivares, cavidade nasal e seios paranasais (BOSE; BROCKTON; DORT, 2013), demonstradas na Figura 3.



**Figura 3.** Estruturas anatômicas em que se pode originar o câncer de cabeça e pescoço (MEDICINANET, 2016).

### 3.2. TRATAMENTO DO CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO

As opções de tratamento para câncer de cabeça e pescoço são variadas, a principal é a cirurgia, contudo a radioterapia e a quimioterapia também aparecem como alternativas (HUANG; O'SULLIVAN, 2013.). A estratégia de tratamento depende do estágio da doença, pacientes que se encontram em estágios iniciais, por exemplo, apresentam altas taxas de cura com cirurgia ou quimioterapia isoladamente. Porém, um dos principais desafios no manejo desse câncer é que a maioria dos pacientes tem doença localmente avançada na primeira apresentação (WINQUIST et al., 2017).

A melhor forma de manejo para o carcinoma oral em estágio avançado é através de uma terapia de multimodalidade, ou seja, um tratamento combinado. De modo geral, a terapia primária envolve cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia (GENDEN et al., 2010).

Galbiatti et al. (2013) descreve três formas principais para o tratamento inicial da doença localmente avançada: quimiorradioterapia baseada em platina, com cirurgia reservada para doença residual; cirurgia com esvaziamento cervical e reconstrução, seguida de radioterapia ou quimiorradioterapia adjuvante, dependendo da presença de fatores de risco adversos; quimioterapia de indução seguida de quimiorradioterapia definitiva e/ou cirurgia.

Dentre os fármacos normalmente utilizados na quimioterapia de carcinoma oral estão: cisplatina, 5-fluoruracila, cetuximabe e taxanos (paclitaxel e docetaxel) (MARTA et al., 2015).

A cisplatina é licenciada mundialmente para o tratamento de diversos neoplasmas sólidos, incluindo o de cabeça e pescoço (GALLUZZI et al., 2014.). A cisplatina é um medicamento antineoplásico que atua inibindo a síntese do DNA pela produção de ligações cruzadas nas fitas do DNA. Além disso, em menor extensão, inibe a síntese de proteínas e ácido ribonucleico (RNA). E aparentemente não é específico do ciclo celular (CISPLATINA, 2016).

A fluoruracila, por sua vez, é um análogo da pirimidina. O metabolismo da fluoruracila interfere na síntese do DNA bloqueando a reação de metilação do ácido desoxiuridílico a ácido timidílico, além disso, inibe a formação de RNA. As células que captam mais fluoruracil são também as que se multiplicam de forma mais rápida, desse modo, os efeitos da redução da síntese de DNA e RNA ocorrem principalmente nestas células (FLUORURACILA, 2016).

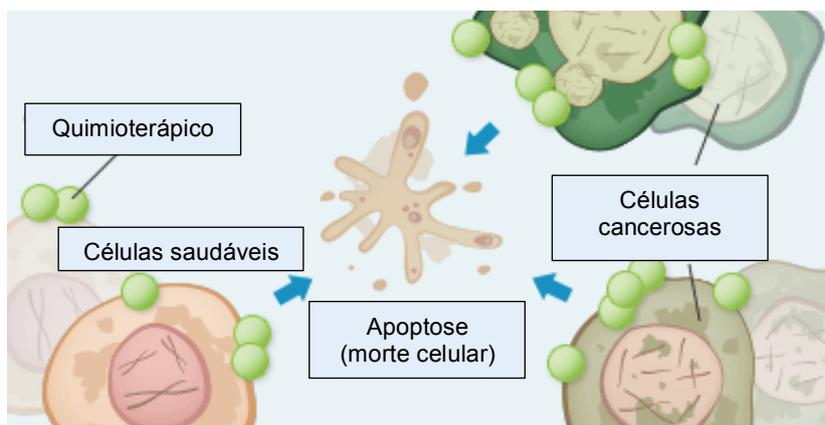
Já em relação ao cetuximabe, este é um anticorpo monoclonal especificamente direcionado ao EGFR. Ele se liga ao EGFR bloqueando a ligação de ligantes endógeno, o que inibe a função do receptor. Ainda, esse medicamento induz a internalização do receptor, contribuindo para a redução da sua regulação, e induz a apoptose de células tumorais humanas que expressam EGFR (ERBITUX, 2016).

O docetaxel e o paclitaxel são agentes antimicrotúbulos. Atuam promovendo a agregação das tubulinas na formação de microtúbulos estáveis, inibindo a sua despolimerização, o que promove diminuição expressiva de tubulina livre, isso impede a dinâmica normal de reorganização da rede de microtúbulos, que é essencial para as funções da célula. Ou seja, eles agem nos processos celulares impedindo que se complete o processo de divisão e multiplicação celular, reduzindo a proliferação das células tumorais (PACLITAXEL, 2016; DOCETAXEL, 2017).

E apesar de todas essas opções de tratamento, ainda existem dificuldades terapêuticas, como a cirurgia que pode ser desfigurante, causar traumas psicológicos e o tumor pode ser recorrente (BALASUNDARAM et al., 2014; MARUR; FORASTIERE, 2016), ao mesmo tempo que altas doses de quimioterapia ou radioterapia podem resultar em diversos efeitos colaterais (MARUR; FORASTIERE, 2016).

Enquanto a radioterapia pode gerar sequelas à longo prazo, como xerostomia, disfagia e osteorradionecrose (GENDEN et al., 2010), os quimioterápicos são capazes de gerar diversas reações adversas. Esses medicamentos não só destroem as células cancerosas, como também danificam algumas células normais de divisão rápida (Figura 4) (RANG et al., 2012), como as da medula óssea, os folículos pilosos, revestimento da

boca e dos intestinos. E assim, podem provocar alopecia, inflamações na boca, perda de apetite, náuseas, vômitos e diarreia, aumento da possibilidade de infecções, aumento da possibilidade de hematomas ou hemorragias, entre outras reações (COLAGIURI et al., 2013).

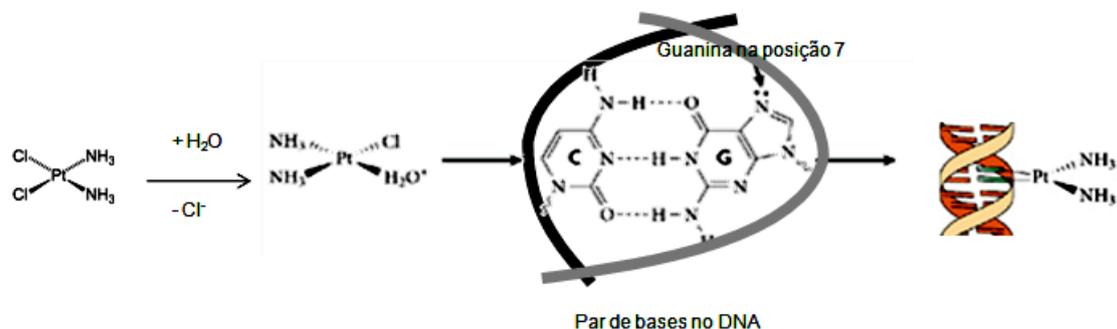


**Figura 4.** Atuação dos quimioterápicos sobre as células cancerosas e saudáveis (adaptado de MESOTHELIOMA GUIDE, 2017).

Atualmente, a prevenção e o diagnóstico precoce são as medidas mais eficazes para melhorar o prognóstico de tumores malignos. Por esse motivo e pelas dificuldades clínicas que surgem durante o tratamento, novas intervenções e abordagens terapêuticas são necessárias para o tratamento desses cânceres (GALBIATTI et al., 2013).

Como citado anteriormente, um dos quimioterápicos utilizados no tratamento do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) é a cisplatina. Os complexos de platina são conhecidos por suas atividades antitumorais e milhares desses complexos foram preparados e testados como potenciais agentes anticancerígenos. Dentre esses, a cisplatina e a OXP entraram globalmente na aplicação clínica (WANG; WANG; GUO, 2015).

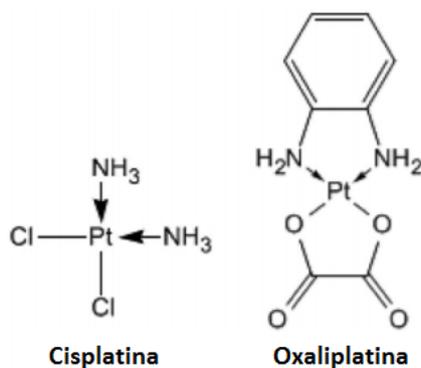
Os compostos de platina interagem com o DNA ocasionando uma lesão a nível molecular. As principais interações ocorrem em centros nucleofílicos na posição N7 das purinas do DNA (Figura 5). Os adutos formados levam a uma distorção na estrutura da hélice e essa lesão ao DNA conduz à apoptose da célula (DILRUBA; KALAYDA, 2016).



**Figura 5.** Modo de ação da cisplatina no DNA (ANDRADE, 2017).

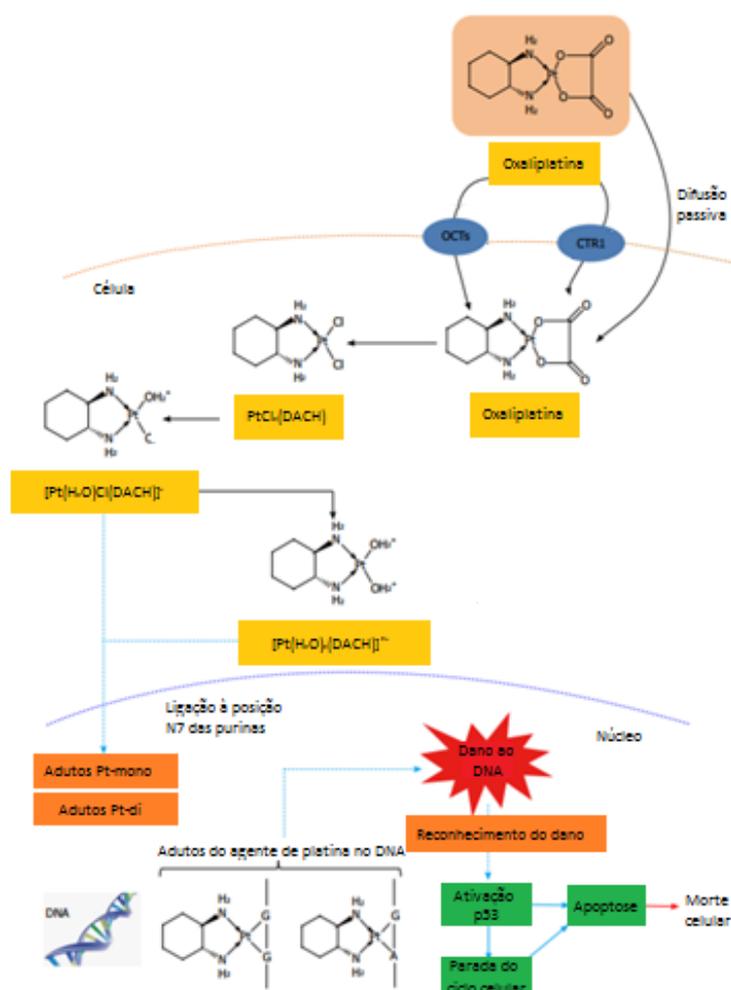
A Cisplatina (Figura 6) foi introduzida em testes clínicos no início da década de 70, tendo como resultado uma droga que era um dos mais eficazes agentes quimioterápicos disponíveis para o tratamento do câncer (FONTES, 1997). Contudo, como a maioria dos quimioterápicos, ela possui vários efeitos tóxicos importantes, como a toxicidade renal, a toxicidade gastrointestinal, ototoxicidade e a neurotoxicidade (CIARIMBOLI, 2012).

A OXP (Figura 6) pertence a uma nova classe de sais da platina, na qual o átomo central de platina é envolvido por um oxalato e um 1,2-diaminociclohexano em posição trans (OXALIPLATINA, 2016).



**Figura 6.** Estrutura química dos compostos de platina (MCWHINNEY, S. R. et al, 2009).

Assim como outros derivados da platina, a OXP exerce seu efeito citotóxico provocando dano ao DNA, inibindo a síntese e formação de novas moléculas nucleícas, consequentemente, a síntese do RNA e das proteínas celulares também são inibidas (ALCINDOR; BEAUGER, 2011). Quando no organismo, a OXP é capaz de entrar na célula por meio da difusão passiva, do transportador copper (CTR) e dos transportadores de cátion orgânico (OCTs). Dentro da célula, várias espécies reativas são formadas, incluindo a monoaquo DACH (1,2-diaminociclohexano) platina  $[Pt(H_2O)Cl(DACH)]^+$  e diaquo DACH platina  $[Pt(H_2O)_2(DACH)]^{2+}$ , que se ligam à macromoléculas, como o DNA, levando a apoptose da célula (Figura 7) (PANCZYK, 2014).



**Figura 7.** Mecanismo de ação da OXP (adaptado de PANCZYK, 2014).

A cinética de ligação da OXP com o DNA é rápida e leva no máximo 15 minutos, enquanto com a cisplatina essa ligação ocorre de forma tardia, após 4 a 8 horas. Além disso, OXP é eficaz sobre certas linhas de tumores resistentes à cisplatina (OXALIPLATINA, 2016). E apesar de também apresentar diversos efeitos tóxicos, a terapia baseada em OXP apresenta um menor risco de neutropenia, anemia, náusea, alopecia, tromboembolismo, estomatite e creatinina aumentada comparada à terapia com cisplatina (HUANG et al., 2016).

Contudo, a seletividade tumoral dos fármacos de platina é bastante baixa, tornando a toxicidade sistêmica e a resistência ao fármaco os maiores defeitos desses complexos (DILRUBA; KALAYDA, 2016). Por esse motivo, é interessante que se desenvolvam novas tecnologias que permitam diminuir a toxicidade do medicamento, sem afetar a sua atividade antineoplásica.

### 3.3. NANOMEDICINA E NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

A nanomedicina pode ser entendida como a ciência e tecnologia das aplicações de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças e intervenções médicas altamente específicas utilizando as ferramentas de nanotecnologia. O objetivo da nanomedicina é compreender melhor as bases fisiopatológicas das doenças para trabalhar à nível molecular, utilizando nanoestruturas capazes de produzir terapias mais eficazes (ESF, 2005; CHANG et al., 2015.).

A nanotecnologia vem ganhando atenção devido à sua alta estabilidade e capacidade transportadora, à capacidade de incorporação de substâncias tanto hidrofílicas, como hidrofóbicas e à sua versatilidade em relação às formas de administração (GUPTA et al, 2014).

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (2007) define nanopartículas como partículas com qualquer formato que apresentam dimensões entre 1 e 100nm. E embora exista essa restrição de tamanho, o termo “nanopartículas”

geralmente se aplica a estruturas que atingem até várias centenas de nanômetros. Diversos tipos de nanopartículas terapêuticas, como lipossomas, nanopartículas de albumina e micelas poliméricas, já foram aprovadas para o tratamento do câncer (SHI et al., 2017).

O crescente interesse em aplicar essa nanotecnologia na terapia contra o câncer é devido às suas características de toxicidade reduzida e eficácia aumentada; à melhoria das propriedades farmacológicas, como estabilidade e solubilidade; à liberação prolongada do fármaco (SCHAFFAZICK, 2003; CALIXTO, 2014); à administração direcionada de medicamentos e de agentes terapêuticos múltiplos, permitindo a administração simultânea de vários fármacos (MAHAPATRO; SINGH, 2011; BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2012.); à obtenção de dispositivos médicos miniaturizados para diagnóstico de câncer, rastreamento e entrega de drogas; e ao desenvolvimento de diagnóstico e imagens mais sensíveis (FERRARI, 2005; SHI et al., 2010; BAETKE; LAMMERS; KIESSLING, 2015;).

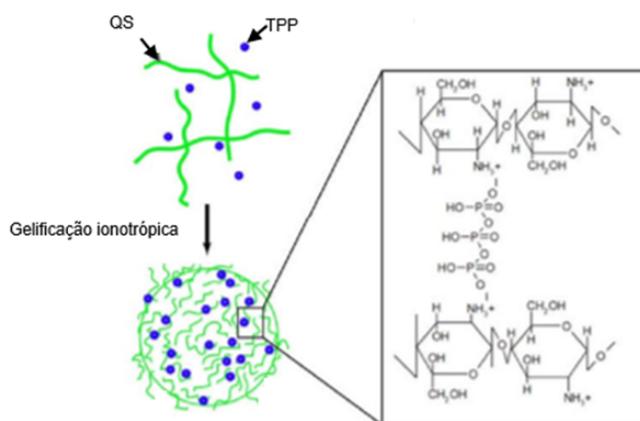
Quando administradas sistemicamente essas nanopartículas apresentam um grande benefício que às diferem do tratamento pelo sistema convencional, são capazes de se acumular no tumor, diminuindo os efeitos toxicológicos dos quimioterápicos. Isso ocorre devido ao efeito de permeabilidade e retenção melhoradas (EPR), que é influenciado pelas propriedades das nanopartículas, como tamanho, geometria, características superficiais, elasticidade, rigidez, porosidade e composição. O EPR é influenciado também por processos fisiopatológicos, como vazamento da vasculatura tumoral, drenagem linfática deficiente e interações no microambiente tumoral, que induzem o acúmulo e retenção das nanopartículas nos tumores, levando à melhora dos resultados terapêuticos (CHANG et al., 2015; MAEDA, 2015; SHI et al., 2017).

Outra vantagem dos nanomateriais é a sua grande área de superfície que permite o carregamento de alta quantidade de agentes terapêuticos. Quando se trata de nanomateriais orgânicos, a sua parte central oca ou porosa permite a encapsulação de centenas de moléculas de fármaco dentro de uma única partícula carreadora. As

moléculas de fármaco vão sendo liberadas à medida que a partícula carreadora se degrada, o que pode minimizar os efeitos adversos, impedindo a absorção não específica de agentes terapêuticos para os tecidos saudáveis (HOBBS et al, 1998; CHOWDHURY et al., 2016).

Um exemplo de material orgânico usado para a obtenção de nanopartículas é a quitosana. A maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos é constituída pela quitina, essa quando sofre o processo de desacetilação, produz a quitosana, um polissacarídeo amino natural catiônico. A quitosana contém uma grande importância econômica e ambiental, devido ao seu baixo custo e às suas características renováveis e biodegradáveis. Por esses fatores e pela sua abundância e atoxicidade, a quitosana vem sendo utilizada como um material potencialmente atraente para usos diversos (AZEVEDO et al., 2007; KEY; PARK, 2017.).

As nanopartículas biodegradáveis de quitosana tem como vantagens suas propriedades mucoadesivas, sua biocompatibilidade e sua baixa toxicidade. Além disso, podem ser produzidas sob condições brandas e em curto período de tempo (CALVO, 1997; PRABAHARAN, 2015). A quitosana promove ainda uma ligação cruzada com vários agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, tripolifosfato de sódio (TPP) (Figura 8), geneipina e etc., isso permite a formação de uma rede eficiente que aprisiona as moléculas de fármaco nas nanopartículas (PRABAHARAN, 2015). Esses nanocarreadores apresentam inúmeras aplicações terapêuticas e uma das áreas mais promissoras é a vetorização de fármacos anticancerígenos (SCHAFFAZICK, 2003).



**Figura 8.** Formação de nanopartículas pela reticulação do polímero positivo pelo TPP negativo (adaptado de PAZ et al., 2011).

### 3.4. MUCOADESIVIDADE

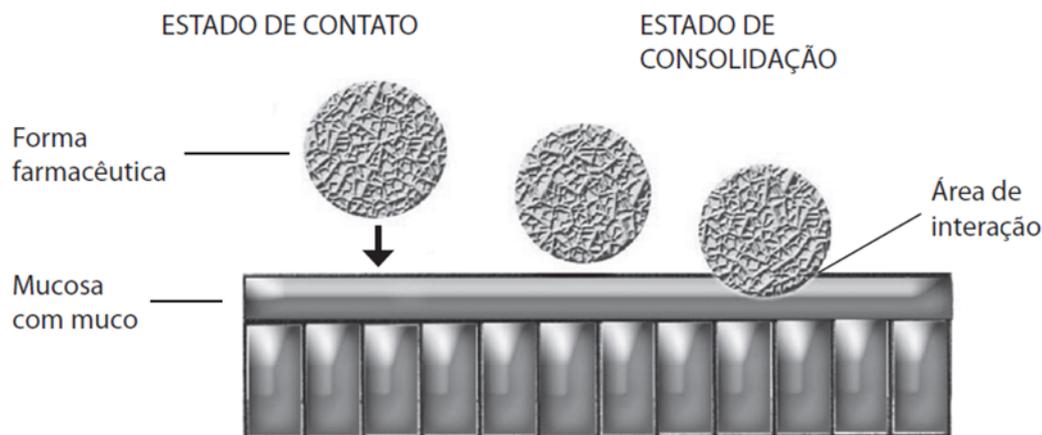
A mucosa bucal é um local que contém uma boa oportunidade para a absorção de fármacos e apresenta uma permeabilidade de quatro a quatro mil vezes maior que a da pele. Sua principal vantagem reside no fato de que o metabolismo de primeira passagem é evitado. Ainda, a mucosa bucal consiste em um epitélio escamoso não queratinizado com uma espessura de aproximadamente 500-800mm, que reveste a região das bochechas da cavidade oral e representa 60% da área total da cavidade oral (ROBLEGG et al., 2012).

As nanopartículas, em contato com essa mucosa bucal, possuem uma melhor atuação quando apresentam mucoadesão, ou seja, quando o material polimérico é capaz de aderir às superfícies mucosas (MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005; NEVES et al., 2011). O sistema de nanopartículas com propriedades mucoadesivas apresentam, inclusive, uma vantagem quando comparado à outros sistemas de liberação de drogas, como micropartículas, pois a sua área de superfície aumentada, ocasionada pela

dimensão nanométrica, permite uma maior interação e contato com a camada mucosa (PARK et al., 2015).

A mucosa oral mencionada é coberta por uma camada de muco, composta principalmente por mucina. A capacidade de ligação dos polímeros à essa membrana mucosa, gerando a mucoadesão, ocorre devido às forças de atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ao efeito hidrofóbico. Apesar desses mecanismos de ligação ainda não serem completamente elucidados, uma teoria sugere que a bioadesão ocorra por meio das interações eletrostáticas, em que os polímeros carregados positivamente, como a quitosana, interajam com as cargas negativas presentes nas macromoléculas de mucina, em pH fisiológico (MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005; NEVES et al., 2011).

Outra teoria é referente ao efeito hidrofóbico, que diz que o sistema de liberação de fármaco mucoadesivo pode ser definido como sistema que usa as propriedades bioadesivas de polímeros solúveis em água, ou seja, que se tornam adesivos durante a hidratação (SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012). Então, o mecanismo de ação dos materiais mucoadesivos sobre as membranas mucosas se dá em duas etapas, a de contato e a de consolidação (Figura 9). A etapa de contato é caracterizada pelo contato íntimo entre o polímero bioadesivo e a membrana mucosa, para que esse estágio ocorra é essencial uma prévia hidratação do polímero bioadesivo, permitindo a sua intumescência e espalhamento. Em seguida, ocorre a consolidação, etapa em que as interações físico-químicas consolidam e fortalecem a ligação bioadesiva, permitindo uma adesão prolongada (BODDUPALLI et al., 2010).



**Figura 9.** Etapas do mecanismo de mucoadesão (adaptado de DIAS et al., 2007).

Em suma, a mucoadesão ocorre quando há uma bioadesão em uma membrana mucosa, isso é, ocorre uma ligação de um polímero natural ou sintético a um substrato biológico por um longo período de tempo por meio de forças interfaciais em uma membrana mucosa (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). O substrato biológico citado compreende as cavidades nasal, retal, vaginal, ocular e oral, que constituem as vias mucosas de administração de agentes terapêuticos (GILHOTRA et al., 2014).

A mucoadesão se tornou um tópico importante para a pesquisa devido ao seu potencial de otimizar a liberação prolongada de fármacos, mantendo a formulação em um contato íntimo com o local de absorção. E, ainda, é uma forma de otimizar a liberação de fármacos em nível local ou sistêmico (PURATCHIKODY et al., 2011).

### 3.5. IONTOFORESE

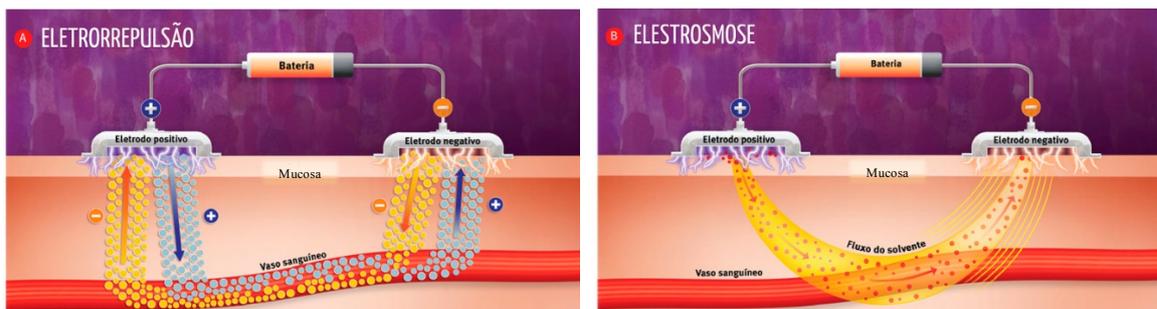
Esse trabalho, além de propor o uso de nanopartículas de quitosana contendo OXP, que apresente mucoadesividade, propõe o uso da técnica de iontoforese. Tal técnica é um método não-invasivo de administração transdérmica de fármacos baseada na transferência de moléculas carregadas usando uma corrente elétrica de baixa intensidade. Essa opção de tratamento apresenta como características uma liberação

mais rápida do fármaco na pele, a capacidade de administrar macromoléculas e um melhor controle da dose administrada (ROUSTIT; BLAISE; CRACOWSKI, 2014).

Iontoforese é a aplicação de uma corrente elétrica fraca que facilita a transferência de substâncias carregadas ou não através de membranas biológicas (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

Tal técnica conecta o tecido a um circuito elétrico e um gradiente de voltagem causando a movimentação dos íons. As moléculas carregadas movem em direção à eletrodos contra-alimentados, que estão em contato com a superfície do tecido através de soluções eletrolíticas que também contém o fármaco. Esse mecanismo permite a liberação de moléculas catiônicas, aniônicas e neutras, o fármaco catiônico ou neutro deverá ficar no eletrodo positivo, ao passo que o aniônico deverá ficar no eletrodo negativo (Figura 10) (CIACH; MOSCICKA-STUDZINSKA, 2011).

Existem dois mecanismos que explicam o aumento do movimento das moléculas sob a influência de um campo elétrico: eletrorrepulsão e a eletrosmose (Figura 10). A eletrorrepulsão se refere ao movimento ordenado de íons na presença de uma corrente elétrica aplicada ao meio. Enquanto a eletrosmose se refere ao fluxo de um volume de solvente e movimentação de cargas quando uma corrente elétrica é aplicada na mucosa (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).



**Figura 10.** (A) Eletrorrepulsão: O eletrodo positivo repele fármacos de carga positiva, fazendo com que atravessem a mucosa. No eletrodo negativo, fármacos de cargas negativas são repelidos. (B) Eletrosmose: O fluxo de um solvente fisiológico promovido pela corrente elétrica entre os eletrodos positivo e negativo permite a transferência de fármacos neutros (adaptado de GRATIERI; GELFUSO; LOPES, 2009).

A mucosa bucal representa um local atrativo para a iontoforese, pois além de passar longos períodos umedecida, apresenta uma menor resistência à passagem da corrente do que a pele, por exemplo, pois não apresenta células queratinizadas presentes no estrato córneo (MOSCICKA-STUDZINSKA; KIJEŃSKA; CIACH, 2009; CUBAYACHI et al., 2015).

Dessa forma, os resultados obtidos com a execução deste projeto irão auxiliar na elucidação de mecanismos envolvidos na penetração transmucosa de OXP nanoencapsulada. E ainda, esse projeto representa o passo inicial para estabelecimento de nova abordagem terapêutica quimioterápica, mais eficiente, com redução de efeitos adversos, que poderá continuar sendo avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal e dará origem a um produto farmacêutico inovador.

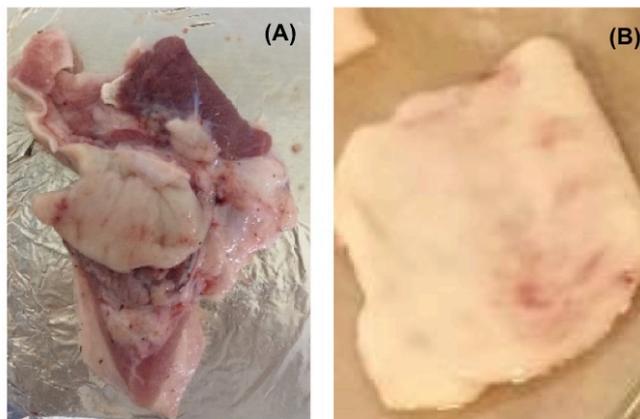
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

A OXP (99%) foi obtida da Simagchem (Xiamen, China). O Ácido Acético 99,9%, quitosana de baixo peso molecular e o tripolifosfato de sódio (TPP) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Solventes como metanol e acetonitrila grau HPLC foram obtidos da Tedia Brazil Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil). O HEPES utilizado para preparo do tampão, pH 7,4, foi obtido da J.T.Baker (Taiwan, China), as correções do pH foram realizadas com ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil). Todas as análises foram realizadas com água tipo Milli-Q (Millipore, França).

### 4.2. MUCOSA

Fragmentos da mucosa bucal de suínos foram retirados logo após o processo de abate dos animais no Frigorífico Bonasa localizado em São Sebastião - Distrito Federal (Figura 11), que gentilmente cedeu o material, e foram transportados para o laboratório sob refrigeração sendo constantemente umedecidos com tampão pH 7,4. Esses pedaços foram mantidos hidratados até a realização dos experimentos, que ocorreu no mesmo dia do abate.



**Figura 11.** Mucosa bucal de suínos: (A) mucosa retirada do suíno após o abate do animal e antes do processo de escalda; (B) vista externa mucosa de suíno limpa.

#### 4.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA OXP

Matos et al. desenvolveram e validaram o método analítico utilizado para quantificar a OXP (MATOS et al., 2016). Resumidamente, 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  $C_{18}$  (250 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) 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 0,5 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 50  $\mu$ L, o forno foi utilizado à temperatura ambiente (25° C) e a detecção UV foi feita em 330 nm.

#### 4.4. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

As Nano-OXP foram preparadas a partir da técnica de gelificação ionotrópica inicialmente proposta por Calvo et al. (1997). Em suma, 20 mL de água Milli-Q foram vertidos sobre 35 mg de quitosana de baixo peso molecular e foi adicionado 1% de ácido

acético, a solução ácida de quitosana foi mantida sob agitação em barra magnética à 500 rpm por 30 min. Logo em seguida, 35 mg de OXP foram adicionados à solução acidificada de quitosana e, novamente, a solução foi colocada sob agitação em barra magnética à 500 rpm por 15 min. Foram então gotejados 2 mL da solução do agente reticulante (TPP) em 5 mL da solução, e deixados por mais 10 min sob agitação. A reticulação do polímero positivo pelo TPP negativo proporciona a formação de nanopartículas de OXP. Nanopartículas de quitosana sem o fármaco, utilizadas como controle, foram preparadas de maneira semelhante, mas sem adição do fármaco à solução inicial de quitosana.

#### 4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Foram analisados o diâmetro hidrodinâmico, o PDI e o potencial zeta das nanopartículas em suspensão aquosa por espalhamento de luz dinâmico e mobilidade eletroforética, respectivamente, utilizando o aparelho Zetasizer Nano ZS. Para avaliação, 1 mL das amostras contendo Nano-OXP e 1 mL das amostras contendo nanopartículas de quitosana foram colocados na cubeta e levados ao equipamento.

A EE foi determinada avaliando-se indiretamente a quantidade de fármaco associado às nanopartículas. Para isto, as suspensões de nanopartículas contendo a OXP foram centrifugadas à 4000 força centrífuga relativa (RCF) por uma hora em uma centrífuga (Nova Ética, Brasil) e o sobrenadante foi filtrado em um filtro de porosidade igual a 0,45 µm acoplado a uma seringa. Foi feita uma diluição de 1:100 (v/v) do filtrado em água e a OXP presente nesta amostra foi quantificado em CLAE, obtendo-se assim a concentração de OXP não encapsulada ( $C_{\text{obtido}}$ ). A concentração de OXP encapsulada foi determinada pela diferença entre a concentração inicial de fármaco adicionado ( $C_{\text{teórico}}$ ) e a concentração de OXP não encapsulada obtida. A EE, então, foi calculada da seguinte forma:

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

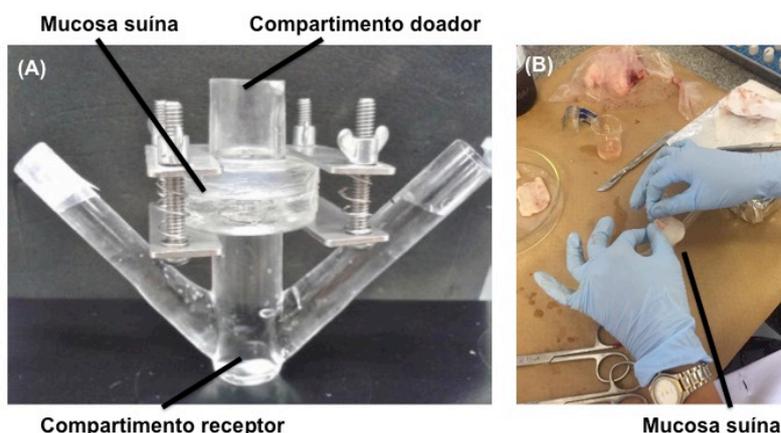
onde: EE% é a eficiência de encapsulação de OXP na nanopartícula;  $C_{\text{obtido}}$  é a concentração de OXP que não foi encapsulado nas nanopartículas de quitosana; e  $C_{\text{teórico}}$  é a concentração de OXP que foi inicialmente colocada para preparo das nanopartículas.

#### 4.6. ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

Para a avaliação da estabilidade física das nanopartículas, foi realizada a análise da suspensão das nanopartículas de quitosana nos dias 0, 1, 3, 7, 15, 30 e 60, em quatro replicatas armazenadas à temperatura ambiente ( $30 \pm 5^\circ\text{C}$ ) e em quatro replicatas armazenadas à temperatura de  $10^\circ\text{C}$ . As análises foram realizadas no aparelho Zetasizer Nano Series, observando possíveis alterações no diâmetro hidrodinâmico de partícula, PDI e potencial zeta e pH. Alteração de pH das suspensões foram acessadas com o auxílio de um pHmetro Digimed pela imersão direta da sonda do equipamento em cada suspensão.

#### 4.7. PERMEAÇÃO *EX VIVO* DA OXP A PARTIR DAS Nano-OXP

Para esses experimentos, células de difusão tipo “Franz” foram montadas com mucosa suína separando os compartimentos doadores dos receptores (Figura 12). Este último compartimento foi preenchido com 15 mL uma solução receptora (tampão HEPES sal de sódio, pH 7,4), mantida sob agitação. Ao compartimento doador, na metade superior da célula, foi adicionado 1 mL da suspensão das Nano-OXP (1,75 mg/mL OXP).



**Figura 12.** Célula de difusão do tipo Franz modificada para estudos *in vitro* de permeação (A) e montagem da célula de difusão tipo Franz com mucosa suína (B).

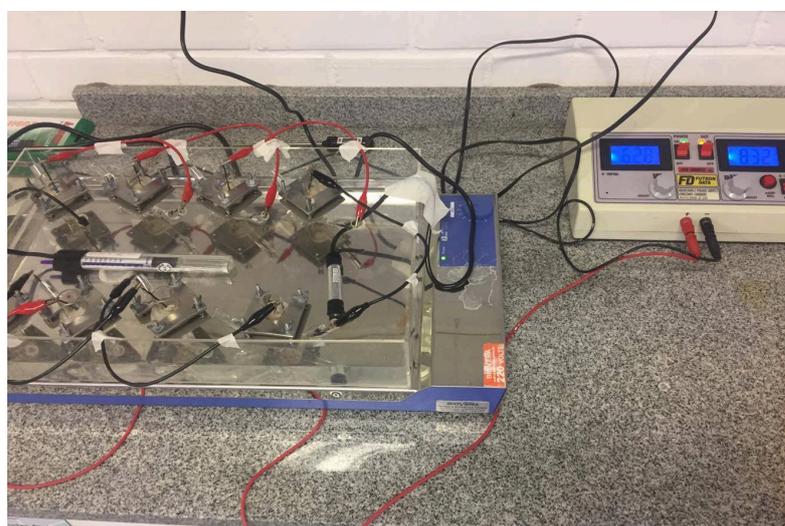
O experimento foi inicialmente realizado por um período máximo de 2h, o que garantiu a viabilidade da mucosa recém-retirada do animal e transportada sob refrigeração para o laboratório. Durante esse período as células mencionadas foram deixadas sob agitação magnética em banho-maria ( $32 \pm 2^\circ\text{C}$ ) (Figura 13). As concentrações de fármaco permeadas através da mucosa foram determinadas pela análise da solução receptora ao final do experimento.



**Figura 13.** Célula de difusão do tipo Franz modificada para estudos *in vitro* de permeação sob agitação magnética em banho-maria.

Após a permeação, a mucosa foi retirada da célula de difusão, picotada e adicionada a um solvente extrator (5 mL de água Milli-Q). A OXP foi extraída da mucosa em contato com a água Milli-Q *overnight*. Depois desse período, 1 mL da solução extratora foi coletado e filtrado, e então analisado para se determinar a quantidade de OXP retida na mucosa. Experimentos utilizando uma solução aquosa do fármaco de OXP também foram realizados para fins de comparação.

A influência de uma corrente elétrica fraca (iontoforese) (Figura 14) sobre a penetração do fármaco a partir das formulações também foi avaliada de maneira semelhante aos experimentos descritos acima, mas com a inserção de um sistema de eletrodos de Ag/AgCl nos compartimentos doador e receptor da célula de difusão, de modo que o eletrodo positivo (Ag) foi colocado em contato com a formulação e o eletrodo negativo (AgCl) em contato com a solução receptora. Esses eletrodos foram então conectados a uma fonte de corrente elétrica e a corrente por área de exposição aplicada foi de  $0,5 \text{ mA/cm}^2$  (GELFUSO et al., 2013).



**Figura 14.** Célula de difusão do tipo Franz modificada para estudos *in vitro* de permeação sob a influência de uma corrente elétrica fraca (iontoforese).

#### 4.8. ANÁLISE DOS DADOS

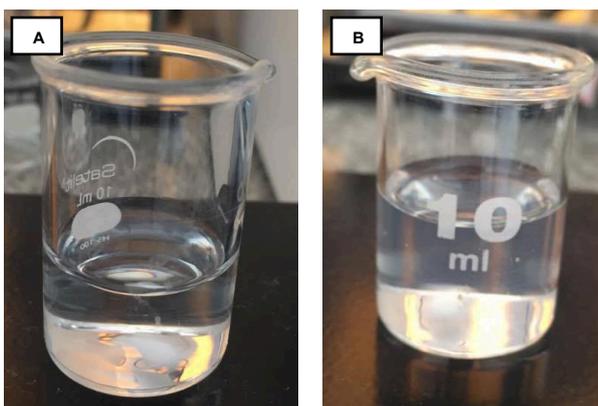
Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, com a significância estatística fixada em  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As Nano-OXP foram preparadas a partir da técnica de gelificação ionotrópica proposta por Calvo et al. (1997) para incorporação de fármaco em nanopartículas de quitosana e foram caracterizadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico das partículas, PDI, potencial zeta e EE do fármaco.

O uso da proporção volumétrica de 5:2 da solução de quitosana (1,75 mg/mL) e da solução de TPP (1,50 mg/mL) resultou em soluções levemente opacas (Figura 15), que de acordo com Calvo et al. (1997), caracterizam a formação de nanopartículas.



**Figura 15.** Nanopartícula de quitosana antes (A) e após (B) a adição da solução de TPP (1,50 mg/mL), em B a solução fica turva.

A Tabela 1 apresenta o tamanho da partícula, PDI, potencial Zeta e a EE das Nano-OXP bem como das nanopartículas sem o fármaco encapsulado utilizadas como controle (Nano controle). O diâmetro médio das nanopartículas nessas concentrações de quitosana e TPP foi de  $283,2 \pm 74,5$  nm.

**Tabela 1.** Diâmetro hidrodinâmico médio (nm), potencial zeta (mV), PDI e EE (%) referentes às Nano-OXP e nanopartículas de quitosana sem o fármaco encapsulado (Nano controle).

<b>Formulação</b>	<b>Tamanho da partícula (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Eficiência de encapsulação (%)</b>
Nano-OXP	283,2 ± 74,5	0,368 ± 0,0280	+ 40,8 ± 2,6	98,9 ± 0,03
Nano controle	261,8 ± 36,8	0,416 ± 0,0346	+ 29,6 ± 1,5	-

O PDI fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos. Um PDI menor indica que as partículas contêm diâmetro mais homogêneo (VIVEK et al., 2014). As nanopartículas obtidas tiveram PDI intermediário, considerando uma escala com valores entre 0-1, demonstrando a formação de sistemas relativamente monodispersos.

As Nano-OXP apresentaram cargas positivas, como indicado na Tabela 1, sendo esse um resultado importante para conferir características mucoadesivas das nanopartículas que entrarão em contato com a mucosa, uma vez que, a capacidade de ligação dos polímeros à membrana mucosa, gerando a mucoadesão, ocorre devido às forças de atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ao efeito hidrofóbico. Justamente essas interações eletrostáticas permitem que a quitosana carregada positivamente (em pH ácido), que compõe a matriz de nossas nanopartículas, interajam com as cargas negativas presentes nas macromoléculas de mucina, que compõe o muco que reveste intimamente a mucosa oral (MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005; NEVES et al., 2011; YU; ANDREWS; JONES, 2014; SUH et al., 2016). Além disso, a alto valor em módulo do potencial zeta indica boa estabilidade física das nanopartículas, pois impede a agregação entre as partículas.

Para determinar a EE foi avaliada a quantidade de fármaco interagindo com as nanopartículas. O resultado obtido mostrou uma elevada concentração de OXP encapsulada, ou seja, quase a totalidade do fármaco quimioterápico (98,9%) encontrava-se associada à nanopartícula. Isso representa uma vantagem das nanopartículas orgânicas, que apresentam parte central oca ou porosa permitindo a encapsulação de moléculas de fármaco dentro de uma única partícula carreadora (HOBBS et al, 1998; CHOWDHURY et al., 2016).

Assim como as Nano-OXP, as nanopartículas de quitosana sem encapsular o fármaco apresentaram um PDI intermediário, considerando uma escala com valores entre 0-1, demonstrando a formação de sistemas relativamente monodispersos. Ainda, essas nanopartículas também obtiveram carga positiva, evidenciando suas características mucoadesivas.

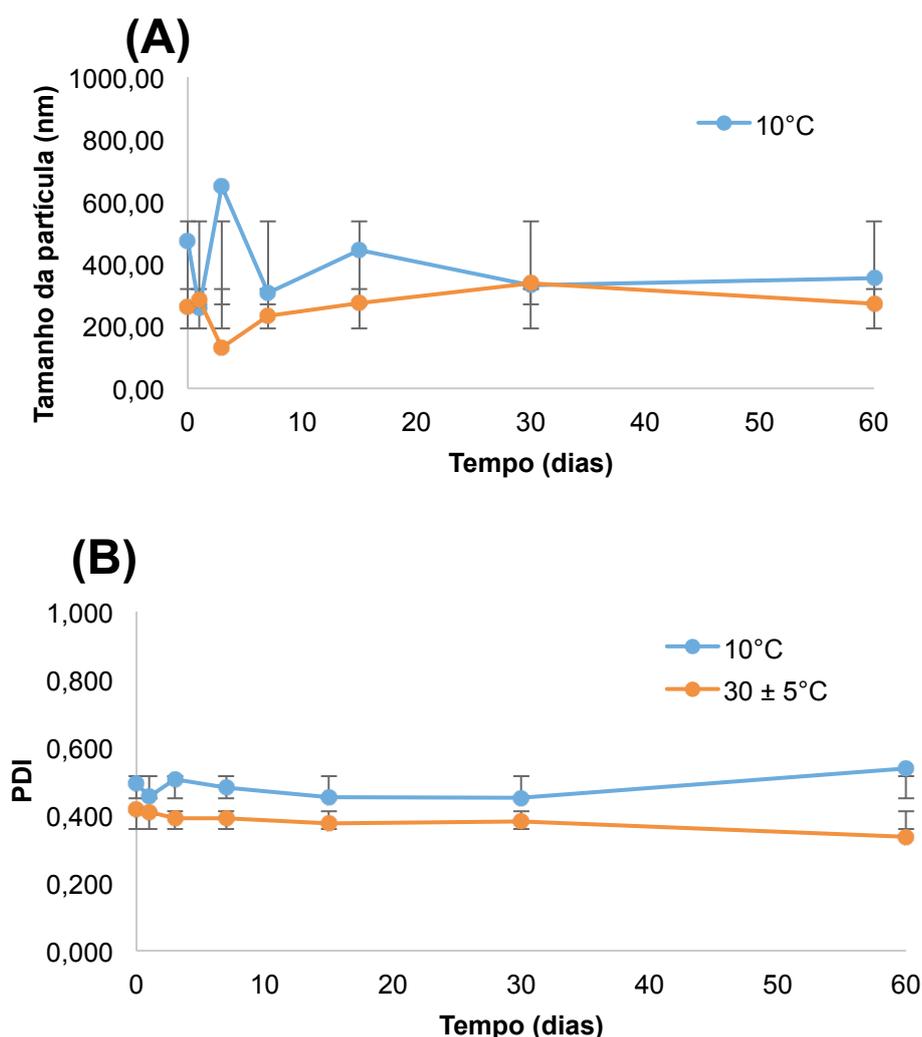
## 5.2. ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

A estabilidade da suspensão das nanopartículas de quitosana foi avaliada nos dias 0 (logo após o preparo), 1, 3, 7, 15, 30 e 60, em quatro replicatas armazenadas à temperatura ambiente ( $30 \pm 5^\circ\text{C}$ ) e em quatro replicatas armazenadas à temperatura de  $10^\circ\text{C}$ . As análises foram realizadas por meio da observação das possíveis alterações do tamanho de partícula, potencial Zeta, PDI e do pH, em cada replicata.

Ao longo dos meses, as partículas numa dispersão coloidal podem se aderir umas às outras, formando agregados, que sob a influência da gravidade vão se sedimentando. Tal comportamento compromete a estabilidade física da dispersão, o que reduz o seu tempo de armazenamento e a validade de um medicamento contendo essas partículas (JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012).

A Figura 16A indica as médias dos tamanhos das partículas, ao longo de 60 dias, de amostras armazenadas à temperatura ambiente ( $30 \pm 5^\circ\text{C}$ ) e à temperatura de  $10^\circ\text{C}$ . No terceiro dia de análise, as nanopartículas de quitosana armazenadas a  $10^\circ\text{C}$ , obtiveram um grande aumento de tamanho, esse aumento já não foi observado no sétimo dia, em

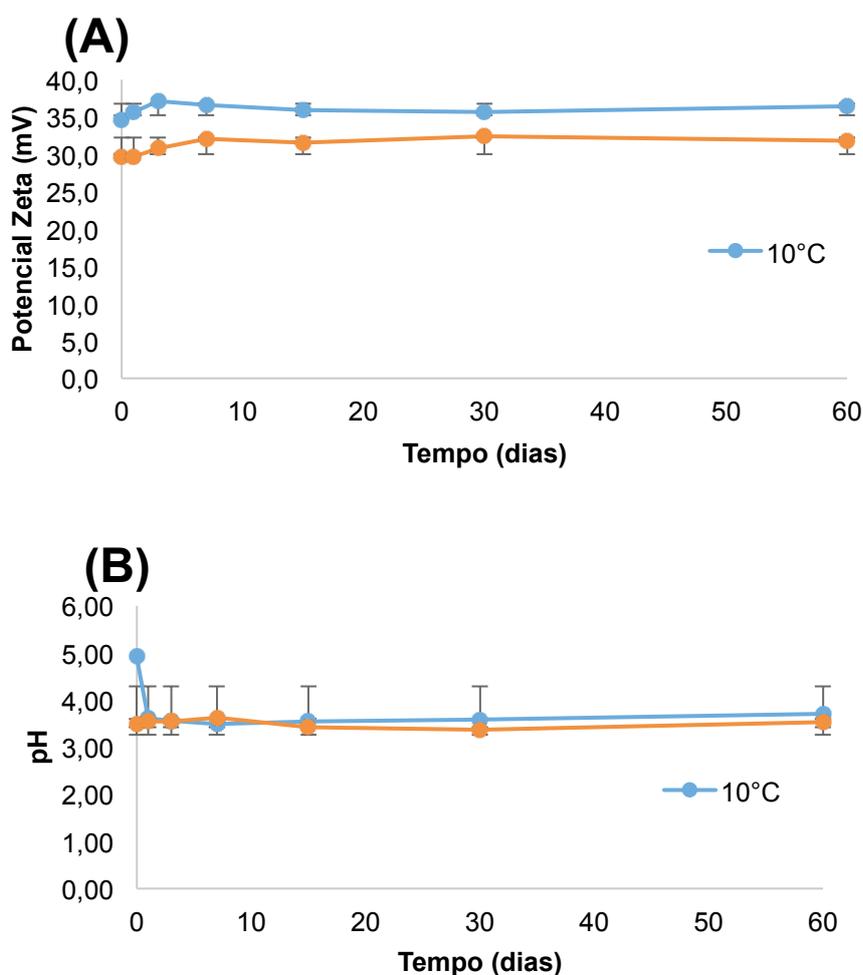
que as nanopartículas de quitosana apresentaram uma redução de tamanho e a partir desse período apresentaram tamanhos mais constantes, demonstrando estabilidade durante esses 2 meses de observação. As nanopartículas de quitosana armazenadas a temperatura de  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ , por sua vez, encontraram-se mais estáveis ao longo do tempo. Essa variação nos primeiros dias de análise indicam a acomodação do sistema, ou seja, há um rearranjo inicial da estrutura das nanopartículas que depois se mantém estável.



**Figura 16.** (A) Diâmetro hidrodinâmico e (B) PDI da dispersão de nanopartículas (nm) em função do tempo referente às replicatas armazenadas à temperatura de  $10^\circ\text{C}$  e  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ .

Como já foi mencionado, o PDI fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, em que menores valores de PDI, indicam uma amostra mais homogênea, em relação ao diâmetro das partículas (VIVEK et al., 2014). Durante dois meses, o PDI (Figura 16B) das nanopartículas (armazenadas à temperatura ambiente ( $30 \pm 5^\circ\text{C}$ ) e à temperatura de  $10^\circ\text{C}$ ) foram medidos, e foi observada uma constância na variação dos tamanhos da população de partículas.

As cargas positivas das nanopartículas também se mostraram constantes ao longo do tempo de análise, tanto nas replicatas armazenadas à  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ , quanto nas replicatas armazenadas à  $10^\circ\text{C}$  (Figura 17A). Assim, as propriedades mucoadesivas das nanopartículas que entrarão em contato com a mucosa devem estar garantidas.



**Figura 17.** (A) Potencial zeta (mV) e (B) pH da dispersão de nanopartículas em função do tempo referente às replicatas armazenadas à temperatura de  $10^\circ\text{C}$  e  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ .

Por fim, o monitoramento do pH das suspensões de nanopartículas em função do tempo também revelou indicativo sobre a sua estabilidade, pois alterações do pH podem ser indicativo de degradação do polímero (SCHAFFAZICK et al., 2003; JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012).

A Figura 17B mostra que a variação dos valores de pH ao longo de todo o período foi mínima, corroborando a estabilidade das dispersões durante os 2 meses de análise. A primeira análise das amostras à temperatura de 10°C foi a que apresentou maior alteração do valor, o que possivelmente ocorreu devido a um viés de aferição ou ao tempo que o sistema demora para se estabilizar.

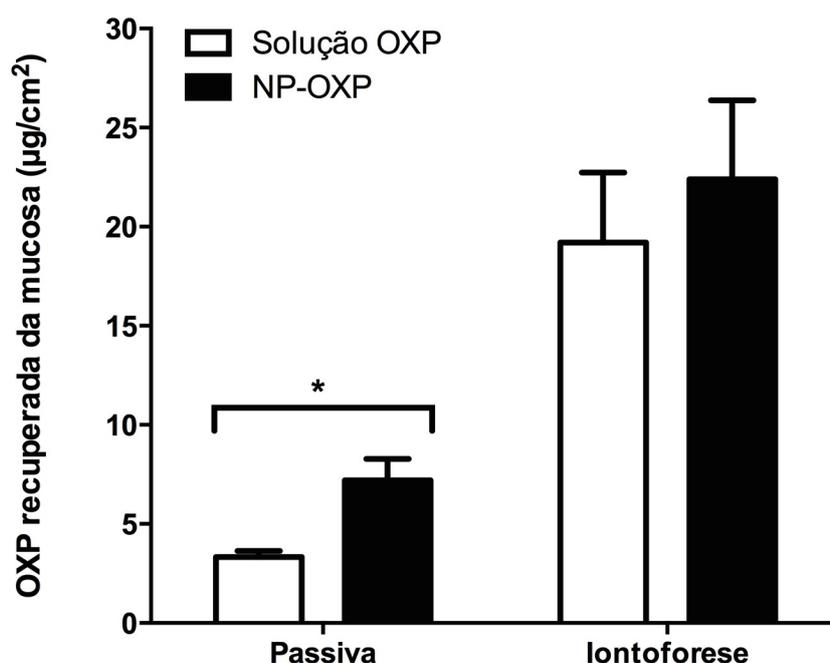
### 5.3. PERMEAÇÃO *EX VIVO* DA OXP A PARTIR DAS Nano-OXP

O termo difusão passiva descreve a passagem de moléculas através de uma membrana que não participa de forma ativa no processo. Os fármacos absorvidos de forma passiva atravessam a membrana através de um gradiente de concentração, em que a passagem das moléculas ocorre do lado de maior para o de menor concentração. A maioria dos fármacos atravessam as membranas biológicas por difusão (ANSEL, 2007). Na iontoforese, além da difusão passiva, a penetração da droga é aumentada pelos mecanismos de eletrorrepulsão, eletrosmose e aumento da permeabilidade da pele ou mucosa (SINGH et al., 2008).

Os experimentos de difusão passiva e iontoforese foram realizados em células de difusão tipo “Franz” montadas com mucosa suína separando os compartimentos doadores dos receptores. O experimento de difusão passiva foi inicialmente realizado por um período máximo de 2h, a solução extratora foi analisada ao final do experimento para se determinar a quantidade de OXP retida na mucosa. Do mesmo modo, foi avaliada a atuação da iontoforese sobre a penetração do fármaco. Para fins de comparação, também foi analisada uma solução aquosa do fármaco de OXP.

O tratamento da mucosa com a dispersão de Nano-OXP resultou em maior recuperação do fármaco se comparado ao tratamento com a solução de OXP, indicando

uma maior permeação da OXP nanoencapsulada (Figuras 18). O aumento observado foi de 2,2 vezes e estatisticamente significativo ( $p > 0.05$ ). Muitos trabalhos mostram que a quitosana tem propriedade promotora da absorção de fármacos, ou seja, atua no tecido interagindo com as cargas negativas da mucosa, promovendo mucoadesão, isso é, um contato íntimo entre o polímero e a membrana mucosa (TAVEIRA; NOMIZO; LOPEZ, 2009; MODI; JOSHI; SAWANT, 2013; CHUAH et al., 2014). Este contato cria um alto gradiente de concentração de fármaco e promove sua absorção passiva (TAVEIRA; NOMIZO; LOPEZ, 2009; MODI; JOSHI; SAWANT, 2013; CHUAH et al., 2014), o que pode explicar a maior recuperação do fármaco na formulação de Nano-OXP, comparada à formulação de solução de OXP.



**Figura 18.** Quantidade de OXP recuperada das mucosas após 2h de aplicação passiva e após 2h de aplicação de uma corrente fraca (iontoforese) das formulações de Nano-OXP e de solução de OXP (controle).

Conforme esperado, a iontoforese aumentou a permeação da oxaliplatina, tanto quando o fármaco esteve em solução, quanto quando encapsulado nas nanopartículas

de quitosana (Figura 18). O aumento significativo foi de ~6 vezes para a solução aquosa e ~3 vezes para as nanopartículas. Gratieri e colaboradores (2008), descreveram a iontoforese como a aplicação de uma corrente elétrica fraca que facilita a transferência de substâncias carregadas ou não através de membranas biológicas (GRATIERI et al., 2008). Esse aumento da transferência de substâncias pode ser observado no gráfico, em que a recuperação de OXP, nas formulações de solução de OXP e de Nano-OXP, obtida após a iontoforese foi maior do que a recuperação após aplicação do sistema de difusão passiva, indicando um aumento da permeação do fármaco na mucosa devido à iontoforese.

A solução de OXP, que não apresenta carga, tem a OXP carregada pelo fluxo eletrosmótico gerado no eletrodo positivo (Ag), que nada mais é que um fluxo de solvente provocado pela entrada preferencial de íons positivos na pele negativamente carregada. O campo elétrico aplicado favorece o movimento de íons no sentido do ânodo para o cátodo, na tentativa de neutralizar as cargas negativas da membrana. Ao se movimentarem, esses íons carregam um certo volume de solvente, movimentando também as moléculas neutras presentes no sistema. Enquanto a formulação de Nano-OXP, que apresenta carga positiva, pelo mecanismo de eletrorrepulsão, obtém o movimento ordenado de íons na presença da corrente aplicada ao meio, ou seja, o fármaco é repelido pelo eletrodo positivo (Ag) atravessando a mucosa; além disso, essa formulação carregada positivamente se beneficia da força adicional do fluxo eletrosmótico que, como mencionado, favorece o transporte de cátions (KALIA et al, 2004).

Assim sendo, ambas as abordagens, passiva e iontoforese, são possíveis. A passiva é de mais simples utilização, pois não requer o uso da corrente elétrica, ao passo que a iontoforese permite uma maior permeação do fármaco e de maneira indolor. Ainda, espera-se que em uma situação *in vivo*, o acúmulo promovido pelas nanopartículas seja mais significativo comparado à solução, pois essas nanoestruturas de quitosana são mucoadesivas e não escorrem na mucosa, como ocorre na formulação contendo a

solução. Próximos ensaios deverão estimular o fluxo salivar na mucosa para verificar a importância desse efeito.

## 6. CONCLUSÃO

As nanopartículas de quitosana contendo OXP apresentaram tamanho médio e PDI adequados, elevada EE e potencial zeta positivo, que garantirá suas propriedades mucoadesivas. As nanopartículas de quitosana apresentaram estabilidade física durante 60 dias, tanto à temperatura de 10°C, quanto à temperatura de  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ . A penetração das nanopartículas na mucosa oral suína foi acentuada após aplicada uma corrente elétrica fraca, demonstrando uma vantagem no uso da iontoforese quando comparada à permeação passiva. Por tanto, nanopartículas somadas às propriedades mucoadesivas e ao uso da técnica de iontoforese podem aumentar a quantidade de fármaco na mucosa, permitindo eficácia terapêutica num tratamento tópico de câncer oral.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCINDOR, T.; BEUGER, N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology*, v. 18, n. 1, 2011.

ALEMÁN, J. V. et al. Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007). *Pure and Applied Chemistry*, v. 79, n. 10, p. 1801-1829, 2007.

ANDRADE, P. Cisplatina. Disponível em: <<https://goo.gl/0H1O4U>>. Acesso em: 05 de maio de 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.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; JR, L. V. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8ª edição. Editora Artemed: São Paulo, 2007.

AROLDI, F. et al. Oxaliplatin-induced hypersensitivity reaction: underlying mechanisms and management. *Journal of Chemotherapy*, v. 27, n. 2, p. 63-66, 2015.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista eletrônica de Materiais e processos*, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BAETKE, S. C.; LAMMERS, T. G. G. M.; KIESSLING, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *The British journal of radiology*, v. 88, n. 1054, p. 20150207, 2015.

BALASUNDARAM, I. et al. Is there any benefit in surgery for potentially malignant disorders of the oral cavity?. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 43, n. 4, p. 239-244, 2014.

BOSE, P.; BROCKTON, N. T.; DORT, J. C. Head and neck cancer: from anatomy to biology. *International journal of cancer*, v. 133, n. 9, 2013.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, v. 64, p. 206-212, 2012.

BUNGET, A. et al. Microscopic aspects of angiogenesis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*, v. 54, n. 3, p. 623-7, 2013.

CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research*, v. 56, n. 11, p. 2488-2492, 1996.

CALIXTO, G. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. *International journal of nanomedicine*, p. 3719-3735, 2014.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci*. v.63, p.125-132, 1997.

CHANG et al. Methotrexate and leucovorin double-modulated 5-fluorouracil combined with cisplatin (MPFL) in metastatic/recurrent head and neck cancer. *J Chin Med Assoc.* v. 71, p. 336-341, 2008.

CHANG, E. H. et al. Nanomedicine: past, present and future—a global perspective. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 468, n. 3, p. 511-517, 2015.

CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of dental research*, v. 87, n. 1, p. 14-32, 2008.

CHOWDHURY, S. et al. An overview of drug delivery vehicles for cancer treatment: Nanocarriers and nanoparticles including photovoltaic nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 164, p. 151-159, 2016.

CHUAH, L. H. et al. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 116, p. 228-236, 2014.

CIACH, T.; MOSCICKA-STUDZINSKA, A. Buccal iontophoresis: an opportunity for drug delivery and metabolite monitoring. *Drug discovery today*, v. 16, n. 7, p. 361-366, 2011.

CISPLATINA. Farm. Resp.: Dr. Ricardo Luiz Gonçalves Medina. São Paulo: Accord Farmacêutica Ltda., 2016. Bula de remédio. Disponível em: <<https://goo.gl/e1fGUk>>. Acesso em 30 de abril de 2017.

COLAGIURI, B. et al. Does assessing patients' expectancies about chemotherapy side effects influence their occurrence?. *Journal of pain and symptom management*, v. 46, n. 2, p. 275-281, 2013.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações genéticas em cânceres de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*, São Paulo, v. 55, n.2, p.165-174, 2009.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS. Cetuximabe no tratamento do câncer de cabeça e pescoço metastático. Disponível em: <<https://goo.gl/Btu18z>>. Acesso em: 23 de outubro de 2016.

CUBAYACHI, C. et al. Needle-free buccal anesthesia using iontophoresis and amino amide salts combined in a mucoadhesive formulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 136, p. 1193-1201, 2015.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, v. 740, p. 364-378, 2014.

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 77, n. 6, p. 1103-1124, 2016.

DOCETAXEL. Farm. Resp.: Dra. Maria Benedita Pereira. São Paulo: Eurofarma Laboratórios S. A., 2017. Bula de remédio. Disponível em: <<https://goo.gl/Baj1xN>>. Acesso em 30 de abril de 2017.

ERBITUX. Farm. Resp.: Alexandre Canellas de Souza. Rio de Janeiro: Merk S.A., 2016. Bula de remédio. Disponível em: <<https://goo.gl/LKKFhM>>. Acesso em 30 de abril de 2017.

- EUROPEAN SCIENCE FOUNDATION. Forward Look on Nanomedicine. França, 2005.
- FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, n. 3, p. 161-171, 2005.
- FLUOROURACILA. Farm. Resp.: Dr. Ricardo Luiz Gonçalves Medina. São Paulo: Accord Farmacêutica Ltda., 2016. Bula de remédio. Disponível em: <<https://goo.gl/Zmt6m7>>. Acesso em 30 de abril de 2017.
- FONTES, A. P. S.; ALMEIDA, S. G.; NADER, L. A. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. *Química Nova*, v. 20, n. 4, p. 398-406, 1997.
- FORCELLO, N. P. et al. Oxaliplatin-induced immune-mediated cytopenias: A case report and literature review. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, v. 21, n. 2, p. 148-156, 2015.
- GALBIATTI, A. L.; PADOVANI, J. A.; MANÍGLIA, J. V.; RODRIGUES C. D. S.; PAVARINO, E. C.; BERTOLLO, E. M. G. Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. *Braz. j. otorhinolaryngol*, São Paulo, v.79, n.2, 2013.
- GALLUZZI, L. et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell death & disease*, v. 5, n. 5, p. e1257, 2014.
- GELFUSO, G. et al. Iontophoresis-targeted, follicular delivery of minoxidil sulfate for the treatment of alopecia. *Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 102, p. 1488-1494, 2013.
- 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.
- GILHOTRA, R. M. et al. A clinical perspective on mucoadhesive buccal drug delivery systems. *Journal of biomedical research*, v. 28, n. 2, p. 81, 2014.
- GRATIERI, T.; GELFUSO, G.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quim Nova*, v.31, n.6, pp.1490-1498, 2008.
- GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPES, R. F. V. Medicação do futuro – iontoforese facilita entrada de fármacos no organismo. *Ciência Hoje*, v.44, n. 259, 2009.
- GRÖBE, Alexander et al. Outcome and fewer indications for adjuvant therapy for patients with oral squamous cell carcinomas under standardized tumor board conditions. *Journal of cancer research and clinical oncology*, v. 142, n. 2, p. 505-520, 2016.
- GUPTA, P. N. et al. Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA: poloxamer blend nanoparticles for cancer chemotherapy. *International journal of biological macromolecules*, v. 69, p. 393-399, 2014.
- HASHIBE, M. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, n. 10, p. 777-789, 2007.

HERRERO, E. P.; MEDARDE, A. F. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 93, p. 52-79, 2015.

HOBBS, S. K. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 95, n. 8, p. 4607-4612, 1998.

HUANG, J. et al. Comparative effectiveness and safety between oxaliplatin-based and cisplatin-based therapy in advanced gastric cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget*, v. 7, n. 23, p. 34824, 2016.

HUANG, S. H.; O'SULLIVAN, B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. O que é o câncer?. Disponível em: <<https://goo.gl/uQ1dEI>>. Acesso em: 20 de outubro de 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE CONTROLE DO CÂNCER. Quimioterapia. Disponível em: <<https://goo.gl/MbUVRd>>. Acesso em: 07 de maio de 2017.

INSTITUTO ONCOGUIA. Câncer de cabeça e pescoço. Disponível em: <<https://goo.gl/ZA6cfY>>. Acesso em: 20 de outubro de 2016.

INSTITUTO ONCOGUIA. Oncogenes e genes supressores do tumor. Disponível em: <<https://goo.gl/t8tQ6G>>. Acesso em: 18 de abril de 2017.

INSTITUTO ONCOGUIA. Efeitos colaterais do tratamento do Câncer de Cabeça e Pescoço. Disponível em: <<https://goo.gl/aE8k0C>>. Acesso em: 02 de maio de 2017.

JARDIM, D. L. et al. Oxaliplatin-related thrombocytopenia. *Annals of oncology*, p. mds074, 2012.

KEY, J.; PARK, K. Multicomponent, Tumor-Homing Chitosan Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 3, p. 594, 2017.

KALIA, Y. N. et al. Iontophoretic drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 56, n. 5, p. 619-658, 2004.

KUMAR, M. et al. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 12, n. 2, p. 458, 2016.

LEMAIRE, F. et al. Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *British journal of cancer*, v. 89, n. 10, p. 1940-1949, 2003.

MAEDA, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Advanced drug delivery reviews*, v. 91, p. 3-6, 2015.

MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of nanobiotechnology*, v. 9, n. 1, p. 55, 2011.

MANNARINI, L. et al. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, v. 29, n. 3, p. 119-126, 2009.

MARTA, G. N. et al. Induction chemotherapy for oral cavity cancer patients: Current status and future perspectives. *Oral oncology*, v. 51, n. 12, p. 1069-1075, 2015.

MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International Journal of Cancer*, 2017.

MATOS, N. B. et al. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *Int J Biol Macromol*. v. 75, p. 225-229, 2015.

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, p. 386-396, 2016.

MCWHINNEY, S. R.; GOLDBERG, R. M.; MCLEOD, H. L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Molecular cancer therapeutics*, v. 8, n. 1, p. 10-16, 2009.

MEDICINANET. Câncer de cabeça e pescoço. Disponível em: <<https://goo.gl/1Jy37U>>. Acesso em 20 de outubro de 2016.

MESOTHELIOMA GUIDE. Chemotherapy side effects. Disponível em: <<https://goo.gl/SYk62G>>. Acesso em: 09 de maio de 2017.

MILLER, N. M.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 57, n. 11, p. 1666-1691, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO – CONTAPP. *Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco*. Rio de Janeiro, 1996.

MODI, J.; JOSHI, G.; SAWANT, K. Chitosan based mucoadhesive nanoparticles of ketoconazole for bioavailability enhancement: formulation, optimization, in vitro and ex vivo evaluation. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 39, n. 4, p. 540-547, 2013.

MOSCICKA-STUDZINSKA, A.; KIJENSKA, E.; CIACH, T. Electroosmotic flow as a result of buccal iontophoresis–buccal mucosa properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 72, n. 3, p. 595-599, 2009.

NEVES, J. et al. Mucoadhesive nanomedicines: characterization and modulation of mucoadhesion at the nanoscale. *Expert opinion on drug delivery*, v. 8, n. 8, p. 1085-1104, 2011.

JONASSEN, H.; KJØNIKSEN, A. L.; HIORTH, M. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 11, p. 3747-3756, 2012.

OXALIPLATINA. *Farm. Resp.*: Eliza Yukie Saito. São Paulo: Blau Farmacêutica, 2016. Bula de remédio. Disponível em: <<https://goo.gl/2bLa6f>>. Acesso em 20 de outubro de 2016.

PACLITAXEL. Farm. Resp.: Dra. Maria Benedita Pereira. São Paulo: Eurofarma Laboratórios S. A., 2016. Bula de remédio. Disponível em: <<https://goo.gl/C194EB>>. Acesso em 30 de abril de 2017.

PANCZYK, M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 29, p. 9775, 2014.

PARK, C. G. et al. Mucoadhesive microparticles with a nanostructured surface for enhanced bioavailability of glaucoma drug. *Journal of Controlled Release*, v. 220, p. 180-188, 2015.

PAZ, L. E. C.; RESIN, A.; HOWARD, K. A.; SUTHERLAND, D. S.; WEJSE, P. L. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on streptococcus mutans biofilms. *Appl Environ Microbiol*, v. 77, n. 11, p. 3892-3895, 2011.

PRABAHARAN, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, v. 72, p. 1313-1322, 2015.

PURATCHIKODY, A. et al. Buccal drug delivery: past, present and future-a review. *International Journal of Drug Delivery*, v. 3, n. 2, p. 171, 2011.

RANG, H.P; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. Fármacos anticâncer. In: *Farmacologia*. RANG, H.P; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2012. p. 673 – 688.

ROBLEGG, E. et al. Evaluation of a physiological in vitro system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa. *Nanotoxicology*, v. 6, n. 4, p. 399-413, 2012.

ROUSTIT, M.; BLAISE, S.; CRACOWSKI, J. L. Trials and tribulations of skin iontophoresis in therapeutics. *British journal of clinical pharmacology*, v. 77, n. 1, p. 63-71, 2014.

RUNDHAUG, J. E.; FISCHER, S. M. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. *Cancers*, v. 2, n. 2, p. 436-482, 2010

SARKAR, S. et al. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 10, p. 21087-21113, 2013.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para a administração de fármacos. *Quim. Nova*, Rio Grande do Sul, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

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

SHI, J. et al. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano letters*, v. 10, n. 9, p. 3223-3230, 2010.

SHINKAR, D. M.; DHAKE, A. S.; SETTY, C. M. Drug Delivery from the Oral Cavity: A Focus on Mucoadhesive. 2012.

SIDDIQUI, I. A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1348, n. 1, p. 20-31, 2015.

SINGH, G. et al. Screening of venlafaxine hydrochloride for transdermal delivery: passive diffusion and iontophoresis. *AAPS PharmSciTech*, v. 9, n. 3, p. 791-797, 2008.

STOJANOVSKA, V. et al. Neurotoxicity Associated With Platinum-Based Anti-Cancer Agents: What are the Implications of Copper Transporters?. *Current Medicinal Chemistry*, v. 24, p. 1-16, 2017.

SUH, J. W. et al. Preparation and Characterization of Mucoadhesive Buccal Nanoparticles Using Chitosan and Dextran Sulfate. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 64, n. 26, p. 5384-5388, 2016.

TAVEIRA, S. F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. *Journal of Controlled Release*, v. 134, n. 1, p. 35-40, 2009.

VIVEK, R. et al. Oxaliplatin-chitosan nanoparticles induced intrinsic apoptotic signaling pathway: A "smart" drug delivery system to breast cancer cell therapy. *International journal of biological macromolecules*, v. 65, p. 289-297, 2014.

WANG, X.; WANG, X.; GUO, Z. Functionalization of platinum complexes for biomedical applications. *Accounts of chemical research*, v. 48, n. 9, p. 2622-2631, 2015.

WINQUIST, E. et al. Systemic therapy in the curative treatment of head and neck squamous cell cancer: a systematic review. *Journal of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, v. 46, n. 1, p. 29, 2017.

XU, Y.; ASGHAR, S.; YANG, L.; CHEN, Z.; LI, H.; SHI, W.; LI, Y.; SHI, Q.; PING, Q.; XIAO, Y. Nanoparticles based on chitosan hydrochloride/hyaluronic acid/PEG containing curcumin: In vitro evaluation and pharmacokinetics in rats. *Int J Biol Macromol*. 2017.

YU, T.; ANDREWS, G. P.; JONES, D. S. Mucoadhesion and characterization of mucoadhesive properties. In: *Mucosal Delivery of Biopharmaceuticals*. Springer US, p. 35-58, 2014.