



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

LUCAS GARCIA CAMARGO

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS MUCOADESIVAS COMPOSTAS POR
DIFERENTES PROPORÇÕES DE QUITOSANA E ALGINATO PARA A
LIBERAÇÃO CONTROLADA DO FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO IMIQUIMODE**

**DEVELOPMENT OF MUCOADHESIVE FILMS COMPOSED BY DIFFERENT
PROPORTIONS OF CHITOSAN AND ALGINATE FOR THE CONTROLLED
RELEASE OF THE ANTINEOPLASTIC DRUG IMIQUIMOD**

CAMPINAS - SP

2017

LUCAS GARCIA CAMARGO

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS MUCOADESIVAS COMPOSTAS POR
DIFERENTES PROPORÇÕES DE QUITOSANA E ALGINATO PARA A
LIBERAÇÃO CONTROLADA DO FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO IMIQUIMODE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Ângela Maria Moraes



Prof. Dra. Ângela Maria Moraes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO LUCAS GARCIA CAMARGO, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. ÂNGELA MARIA MORAES

CAMPINAS – SP

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 33003017034P8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

C14d Camargo, Lucas Garcia, 1990-
Desenvolvimento de membranas mucoadesivas compostas por diferentes proporções de quitosana e alginato para a liberação controlada do fármaco antineoplásico imiquimode / Lucas Garcia Camargo. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quitosana. 2. Alginatos. 3. Imiquimode. 4. Membranas. 5. Carcinoma de células escamosas. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of mucoadhesive films composed by different proportions of chitosan and alginate for the controlled release of the antineoplastic drug imiquimod

Palavras-chave em inglês:

Chitosan

Alginates

Imiquimod

Films

Squamous cell carcinoma

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ângela Maria Moraes [Orientador]

Theo Guenter Kieckbush

Ana Paula Rodrigues

Data de defesa: 31-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Lucas Garcia Camargo e aprovada em 31 de agosto de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Ângela Maria Moraes

Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbush

Dra. Ana Paula Rodrigues

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, minha guia, minha luz, minha inspiração. Sem ela, nada do que fui, sou e serei jamais existiria. Sua existência é uma constante na qual pude sempre me apegar, e seu amor, carinho e devoção, guardar sempre comigo. Uma eterna fonte de luz no meu coração, iluminando os mais escuros caminhos.

A toda a minha família e todos os meus amigos que pude contar em todos os momentos desta árdua jornada: minha eterna gratidão. Estes compõem a família que tive o prazer de escolher, e formar para sempre a minha eterna *Ohana*.

À prof. Dra. Ângela Maria Moraes, pelos anos de dedicação e orientação tanto profissional quanto pessoal, instruindo a cada passo, lapidando todas as pontas e criando verdadeiros diamantes de meras rochas brutas.

Aos membros da banca, ambos do exame de qualificação e da defesa de dissertação, por toda a contribuição dada a este trabalho.

À profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino e demais membros do laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Renata Nishida Goto e à Cristiana Bernadelli Garcia pelos ensaios realizados e acolhimento no laboratório.

À profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite e aos demais membros do Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em especial à Stephany di Carla Santos.

À Gabriela Souza Rezende, pela parceria na coleta de parte dos dados experimentais, pela amizade e por todo o apoio neste período.

À Acecil, Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, pela esterilização das membranas utilizando-se o óxido de etileno.

À EMS pela doação do fármaco imiquimode.

À equipe do LRAC, pelos ensaios realizados e esclarecimentos prestados.

À UNICAMP e ao Programa de Pós-Graduação da FEQ.

A todos os membros e funcionários da Faculdade de Engenharia Química que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

*“After all this time?
Always.”*

J. K. Rowling

RESUMO

O carcinoma de células escamosas possui uma das maiores taxas de incidência dentre todos os tipos de cânceres, e, visando o tratamento desta neoplasia, desenvolveu-se e caracterizou-se filmes poliméricos constituídos de quitosana (Q) e alginato (A) em diferentes proporções, incorporando o fármaco antineoplásico imiquimode (IQ) por adição direta à suspensão dos polissacarídeos isolados ou complexados ionicamente entre si. Observou-se que a adição do fármaco, em geral, diminui o diâmetro e aumenta a espessura em até 450% no caso das membranas constituídas somente de alginato. A opacidade das membranas aumentou até 5 vezes, mas ainda assim, o maior valor apresentado foi de 5,14% para a formulação QA 1:3 com o fármaco, possibilitando, portanto, o monitoramento visual da evolução do processo de cicatrização da lesão. Em contato com soluções fisiológicas as membranas absorveram até 2,31 gramas de água por grama de material para a formulação QA 1:1 e 10,42 g/g para a de alginato em saliva simulada, sendo que todas as membranas foram solubilizadas em solução salina, exceto a de quitosana. A adição do IQ em geral reduziu a absorção fluidos. As membranas apresentaram eficiência de incorporação variando de 55 a 99%, respectivamente para as formulações constituídas de A e Q somente. Em solução de tampão acetato e de saliva simulada, as membranas apresentaram liberação com mecanismo predominantemente difusivo, enquanto em solução salina esta foi associada a fenômenos de intumescimento e erosão da membrana, resultando em liberações de 28 a 423 µg de fármaco na solução salina, valores estes apropriados para uso bucal. As membranas não apresentaram diferença estatística significativa entre as formulações com relação à propriedade de mucoadesividade, e as análises termogravimétricas e de espectroscopia no infravermelho (FTIR) demonstraram que ocorrem interações entre o IQ e os polímeros Q e A. A tensão de ruptura variou de 16,43 a 64,17 MPa para as membranas sem IQ, e 4,75 a 18,25 MPa para aquelas com a droga. O alongamento na ruptura variou de 1,65 a 3,62% para as formulações sem IQ, e 2,27 a 3,39% para as formulações com fármaco. Os ensaios biológicos demonstraram que o imiquimode livre não possui ação direta sobre as linhagens tumorais FaDu e HN13, mas sim sobre a 4T1. As formulações QA 1:1 e Q mostraram, respectivamente, os melhores desempenhos nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* direta e indireta com células 4T1, confirmando sua potencialidade de aplicação como veículo alternativo de liberação de imiquimode para o tratamento desta neoplasia.

Palavras-chave: quitosana, alginato, imiquimode, membranas mucoadesivas, tumor de células escamosas.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma has one of the highest incidence rates among all types of cancer, and, in order to treat this neoplasia, polymer films consisting of the polysaccharides chitosan (Q) and alginate (A) were developed, and characterized, in different proportions, incorporated with the antineoplastic imiquimod (IQ) by directly adding it to either the isolated polysaccharide suspension or the ionically complexed ones. It was observed that the addition of the drug generally decreases the diameter and increases the thickness by up to 450% in the case of films composed only of alginate. The opacity of the films increased up to 5 times, but still the highest value was 5,14% for the QA 1:3 formulation with the drug, thus allowing the visual monitoring of the evolution of the wound healing process. In contact with physiological solutions the films absorbed up to 2,31 grams of water per gram of material for the QA 1:1 formulation and 10,42 g/g for that of alginate in simulated saliva, and all films solubilized in saline solution, except for chitosan. The addition of IQ generally reduced fluid absorption. It was possible to determine, from *in vitro* tests, that the films presented incorporation efficiency of 55 to 99%, respectively for the formulations composed of A and Q only. In acetate buffer and saliva solution, the films presented a predominantly diffusive release, whereas for saline solution, it was mainly related to swelling and erosion phenomena, resulting in releases of 28 to 423 μg of drug in saline solution, showing that they may be suitable for oral use. The films showed no significant statistical difference between the formulations with respect to the properties of mucoadhesion, and that the thermogravimetric and infrared spectroscopy (FTIR) analysis demonstrated that there is some interaction between the IQ and the polymers Q and A. The tensile strength ranged from 16,43 to 64,17 MPa for films without IQ, and 4,75 to 18,25 MPa for those with the drug. The elongation at break ranged from 1,65 to 3,62% for the formulations without IQ, and 2,27 to 3,39% for formulations with drug. The biological assays showed that free imiquimod has no direct action on the FaDu and HN13 cell lines, but has on the 4T1 line. The QA 1:1 and Q formulations obtained, respectively, the highest performances in the direct and indirect tests of cellular viability for the 4T1 cells, confirming their potential for application as an alternative imiquimod release vehicle for the treatment of this neoplasia.

Keywords: chitosan, alginate, imiquimod, mucoadhesive films, squamous cell tumor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: alginato

AL: alongamento na ruptura

Abi: absorção de soluções fisiológicas

ACS: American Cancer Society

CC: citosina-citosina

CCE: carcinoma de células escamosa

CE: carcinoma epidermoide

CEO: carcinoma epidermoide oral

CMC: carboximetilcelulose

CT: citosina-timina

DSC: calorímetro diferencial de varredura

ϵ : eficiência

EUA: Estados Unidos da América

FDA: Food and Drug Administration

FTIR: espectroscopias no infravermelho com Transformada de Fourier

G: α -L-guluronato

HPV: papiloma vírus humano

IFN: interferon

IL: interleucina

IQ: imiquimode

LEBC: laboratório de engenharia de biorreações e coloides

LRAC: laboratório de recursos analíticos e de calibração

M: (1,4) β -D-manuronato

M_t , M_0 , M_∞ e $M_{teórico}$: massas totais acumuladas liberadas nos tempos t, inicial. Infinito e incorporada

n: expoente de liberação (expoente difusional)

NF: fator nuclear

P_i : perda de massa

PEC: complexo polieletrólito

PLGA: poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

PMVE/MA: poli(metil vinil éter-co-anidrido maleico)

PVP: poli(vinilpirrolidona)

Q: quitosana

QA: membrana de quitosana e alginato

QA 1:1: membrana de quitosana e alginato com proporção de 1:1, respectivamente

QA 1:3: membrana de quitosana e alginato com proporção de 1:3, respectivamente

R²: coeficiente de determinação

t: tempo

T₁ a T₄: eventos térmicos

T_R: tensão na ruptura

TGA: análise termogravimétrica

TLR: receptor tipo Toll

TNF: fator de necrose tumoral

TT: timina-timina

UV: ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivo	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Carcinoma de células escamosas	16
2.1.1 Desenvolvimento de CCE na pele	16
2.1.2 Ocorrência na região bucal	17
2.1.3 Formas de tratamento	18
2.2 Incorporação de fármacos em matrizes poliméricas	19
2.2.1 Quitosana	21
2.2.2 Alginato	22
2.2.3 Complexos Polieletrólitos (PEC)	24
2.3 Imiquimode e seu mecanismo de ação	26
2.4 Sistemas mucoadesivos para a liberação localizada de fármacos	28
2.5 Mecanismos de liberação controlada de fármacos incorporados em matrizes poliméricas	30
2.6 Considerações Finais	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Reagentes	34
3.2 Métodos	34
3.2.1 Preparação das membranas	34
3.2.2 Caracterização das membranas	38
3.2.2.1 Aspecto e morfologia da superfície	39
3.2.2.2 Cor e opacidade	39
3.2.2.3 Diâmetro e espessura	40
3.2.2.4 Capacidade de absorção de soluções fisiológicas e perda de massa	40
3.2.2.5 Análise da eficiência de incorporação de Imiquimode	41
3.2.2.6 Cinética de liberação do imiquimode	43
3.2.2.7 Determinação da mucoadesividade da membrana	44
3.2.2.8 Propriedades Mecânicas	45
3.2.2.9 Análise Termogravimétrica (TGA)	46
3.2.2.10 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	46
3.2.2.11 Ensaios biológicos in vitro	46
3.2.2.11.1 Análise da citotoxicidade	47
3.2.2.11.2 Análise de proteínas por Western blott	48

3.2.2.12	<i>Análise estatística</i>	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Aspecto Análise da Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura	51
4.2	Diâmetro e Espessura	57
4.3	Cor e Opacidade	58
4.4	Capacidade de Absorção e Perda de Massa	59
4.5	Eficiência de incorporação de Imiquimode	62
4.6	Cinética de Liberação	64
4.6.1	<i>Saliva simulada</i>	65
4.6.2	<i>Solução de tampão acetato</i>	68
4.6.3	<i>Solução salina tamponada</i>	71
4.6.4	<i>Avaliação conjunta dos dados de liberação</i>	74
4.7	Determinação da mucoadesividade da membrana	77
4.8	Propriedades mecânicas	78
4.9	Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	81
4.10	Análise Termogravimétrica (TGA)	83
4.11	Ensaio biológicos in vitro	86
4.11.1	<i>Teste de viabilidade celular (Resazurina ou Alamar Blue)</i>	86
4.11.2	<i>Análise de proteínas por Western blot</i>	91
5.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	94
5.1	Conclusões	94
5.2	Sugestões para trabalhos futuros	95
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) ou carcinoma epidermoide (CE), é um tumor altamente invasivo, apresentando um alto risco de metástase, sendo um dos cânceres de maior incidência da atualidade, e apresentando grandes chances de reincidência. Seu desenvolvimento se dá em tecidos recobertos por epitélio escamoso, tais como a pele, pulmão, boca, cérvix, entre outros (American Cancer Society, 2017; Czarnecki *et al.*, 1994; Miller e Weinstock, 1994).

Alguns motivos que explicam a alta incidência deste tipo de carcinoma é a sua forte relação com a exposição ao sol, o uso de tabaco e infecções virais. Além disso, este apresenta uma frequente ocorrência de metástase nos linfonodos, pulmão e outros pontos distantes (Marinkovich, 2007), portanto a detecção e o tratamento precoce são cruciais, visto que a excisão deste tumor resulta, com frequência, em sequelas estéticas e funcionais, afetando a capacidade de engolir e movimentar membros essenciais (Desai *et al.*, 2011).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2016), em 2012 foi relatada a ocorrência de 300 mil novos casos no mundo de CCE bucal, e, de acordo com a American Cancer Society (2017), estimou-se que mais de 3 milhões de pessoas foram afetadas em 2015 pelo CCE de pele ou pelo carcinoma de célula basal, dos quais aproximadamente 20% serão levados a óbito. Segundo a Fundação do Câncer Oral dos Estados Unidos (OCF), o gasto médico total estimado nos Estados Unidos (EUA) destinado ao tratamento de cânceres localizados na cabeça e no pescoço, no qual se insere o CCE, foi de aproximadamente \$3,2 bilhões de dólares (Oral Cancer Foundation, 2010).

O órgão responsável pela determinação das diretrizes diagnósticas e terapêuticas do câncer de cabeça e pescoço no Brasil é o Ministério da Saúde (2015), através da Portaria 516, sendo a cirurgia o principal tipo de tratamento empregando, com o uso ocasional de adjuvantes locais e radioterapia conforme a problemática.

Entretanto, visto que a ressecção cirúrgica possui potenciais efeitos colaterais, neste trabalho buscou-se desenvolver biomateriais úteis para aplicação no tratamento de CCE atingindo especificamente a pele e a região bucal. Esta abordagem congregou conhecimentos do Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides (LEBC) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP a respeito do uso de membranas de polissacarídeos contendo ou não agentes bioativos para o tratamento de lesões de pele com importantes contribuições da equipe coordenada pela Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da área de bioquímica clínica, e da equipe de pesquisa

coordenada pela Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite do Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

A American Cancer Society (2017) indica, entre os diversos adjuvantes locais utilizados como quimioterápicos tópicos e modificadores de resposta imune, o fármaco imiquimode, que apresenta amplo embasamento literário e suficiente longo uso clínico e eficácia. Assim, escolheu-se incorporar este princípio ativo em membranas de quitosana e alginato, polissacarídeos já extensivamente estudados pelo grupo de pesquisa do LEBC para a realização da presente dissertação.

Estes polímeros, quando misturados, são capazes de formar complexos polieletrólitos (PEC), através da atração eletrostática dos grupamentos carboxilato do alginato com aminas protonadas da quitosana, e ainda de ligações de hidrogênio entre as cadeias, formando uma estrutura com grande estabilidade estrutural e a variações no pH, apresentando ainda maior eficiência no controle da liberação de princípios ativos (Yan, Khor e Lim, 2000).

Visto que há poucas contribuições na literatura acerca da incorporação do imiquimode em filmes ou membranas poliméricas (Donnelly *et al.*, 2006; Ramineni *et al.*, 2014) particularmente no que se refere a formulações mucoadesivas, visto que sua aplicação mais comum é na terapia de lesões de pele, buscou-se neste trabalho desenvolver e investigar dispositivos inovadores que pudessem ser aplicados com sucesso em lesões orais, mas que também tivessem potencial de uso em mucosas de outras regiões do organismo e, eventualmente, também em feridas de pele.

1.1 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo geral a produção e caracterização de dispositivos com capacidade mucoadesiva constituídos dos polissacarídeos quitosana e alginato, isolados ou em conjunto, para a liberação controlada do agente antineoplásico imiquimode visando ao tratamento de tumores de pele e de mucosa, particularmente tumores bucais.

Teve-se como objetivos específicos produzir um sistema que atendesse aos seguintes atributos críticos de qualificação:

- a) adequada resistência mecânica do material, de modo que este não se rompa ao ser manuseado, mas não a ponto de se mostrar rígido, desconfortável e de difícil aplicação e manutenção no tecido lesionado;
- b) baixa opacidade, de modo que seja possível a visualização e o monitoramento do tecido

lesionado;

- c) estabilidade apropriada nas condições de utilização referentes à temperatura, umidade relativa e pH do local da lesão;
- d) perfil de liberação da droga predominantemente contínuo pelo período de uso no local da lesão;
- e) uniformidade quanto ao aspecto e à distribuição da droga na estrutura do filme, de modo que biomateriais obtidos em diferentes lotes apresentem resultados reprodutíveis entre si.

As hipóteses específicas que se desejava averiguar, fundamentadas nos atributos críticos de qualificação anteriormente mencionados, são listadas a seguir:

- a) o sistema produzido atinge os atributos de qualidade críticos adequados no que se refere à estabilidade mecânica, temperatura, umidade relativa e ao pH da boca e da pele?
- b) qual ou quais das formulações será(ão) mais potencialmente adequada(s) em termos da combinação das duas propriedades mais relevantes para a finalidade proposta, mucoadesividade e capacidade de liberação sustentada do fármaco para o tratamento local?
- c) é possível a produção de membrana(s) contendo imiquimode com características que possibilitem seu uso, com eficiência, no tratamento local de carcinoma de células escamosas, de forma a se mostrar mais competitiva para a terapia de lesões em regiões úmidas que os cremes dermatológicos comercialmente disponíveis contendo o mesmo princípio ativo?

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma de células escamosas

O carcinoma de células escamosas (CCE) ou carcinoma epidermoide (CE), também conhecido como carcinoma de células espinhosas ou espinocelular, é uma neoplasma maligno altamente invasivo que apresenta alto risco de metástase e morbidade. Este pode se desenvolver em diversos tecidos cobertos com epitélio escamoso, promovendo cânceres de pele, pulmão, bucal, cervical, gástrico e colorretal, dentre outros. Devido à diversidade de tecidos que podem ser afetados, o CCE é o mais comum dos cânceres capazes de sofrer metástase (Czarnecki *et al.*, 1994; Miller e Weinstock, 1994; Oral Cancer Foundation, 2010).

A incidência do CCE está fortemente ligada a fatores externos, como exposição ao sol, uso de tabaco e infecções virais. Esta doença possui um elevado risco de recidiva e requer técnicas cirúrgicas específicas para sua completa excisão, observando-se, com frequência, a ocorrência de metástase para os linfonodos, pulmão e outros pontos distantes (Marinkovich, 2007).

A melhor estratégia para enfrentar este tipo de doença é a detecção e o tratamento precoce, quando o tumor ainda se encontra em um estágio pré-canceroso, sem metástases e grande espalhamento no tecido. Como as lesões resultantes deste tipo de câncer são visíveis externamente, seu diagnóstico torna-se mais fácil e preciso.

Este trabalho aborda o CCE quando este afeta especificamente a pele ou a boca do paciente, por esta razão, lesões nestes tecidos são mais detalhadamente discutidas a seguir.

2.1.1 Desenvolvimento de CCE na pele

O câncer de pele do tipo CCE é a neoplasia mais comum na população branca, e estima-se que, em 2015, mais de 3 milhões de pacientes tenham sido afetados por esta neoplasia ou pelo carcinoma de célula basal (American Cancer Society, 2017). Desenvolve-se mais comumente em pele com lesões actínicas, conhecidas como queratose actínicas (QA) ou queratose solar, que são tumores escamosos, avermelhados e benignos, causados pela excessiva exposição solar, surgindo, portanto, principalmente na cabeça, pescoço, costas das mãos e antebraço da população mais idosa e de pele mais clara (Green e Olsen, 2017).

A demasiada exposição à radiação ultravioleta (UV) pode levar à produção de mutações no DNA decorrente de genotoxicidade direta ou causada por espécies oxigenadas reativas, dependendo do comprimento de onda da radiação envolvida. A radiação ultravioleta

do tipo B afeta normalmente o gene supressor de tumores p53, através de mutações predominantemente do tipo transição de bases nitrogenadas do tipo citosina (C) para timina (T), transição CT, incluindo também CC para TT.

Já a radiação ultravioleta A pode causar danos à célula e ao DNA através da formação de espécies oxigenadas reativas, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Esta afeta ainda a função imunológica do paciente, ao afetar a ação dos supressores de linfócitos T.

Em células normais, uma única mutação no gene p53 desencadeia um mecanismo de apoptose e morte celular, desde que o segundo gene p53 permaneça intacto e funcional. Já células com um destes genes p53 disfuncional, uma mutação adicional resultante da radiação UV pode prevenir a ocorrência do processo de apoptose e dar início a formação tumoral (Hawrot, Alam e Ratner, 2003).

2.1.2 Ocorrência na região bucal

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer bucal do tipo CCE é uma das neoplasias mais comuns em homens e mulheres, com estimativa de ocorrência de 300 mil casos novos no mundo em 2012 (INCA, 2016), atingindo com maior incidência a fumantes e ávidos consumidores de bebidas alcoólicas (Brenner *et al.*, 2007). Estima-se que, em 2017, aproximadamente 50 mil novos casos serão diagnosticados nos EUA, o que compreenderá aproximadamente 3% do total de novas ocorrências, que supostamente levarão a óbito em torno de 20% dos pacientes afetados (American Cancer Society, 2017). Em 2010 o gasto médico total estimado nos EUA destinado ao tratamento de cânceres localizados na cabeça e no pescoço foi de aproximadamente \$3,2 bilhões de dólares (Oral Cancer Foundation, 2010).

Esta patogenia se desenvolve a partir de epitélios mucosos compostos de células alteradas geneticamente, formando um grande campo pré-neoplásico, como, por exemplo, a leucoplasia, uma lesão branca da cavidade oral, que é a mais comum precursora do CCE oral (Leemans, Braakhuis e Brakenhoff, 2011).

Outros potenciais precursores desta doença são: o campo de cancerização da mucosa oral, região circundante ao tumor onde podem ser observadas alterações displásicas, as quais não são visíveis a olho nu, como exemplo, a perda de heterozigosidade dos cromossomos 3p, 9p e 17p; alterações nas vias de sinalização celular e ainda infecções com presença do papilomavirus humano (HPV), o qual resulta na desativação do gene p53, imunossupressão e na carcinogênese (Hawrot, Alam e Ratner, 2003).

2.1.3 Formas de tratamento

A Portaria 516, redigida pelo Ministério da Saúde (2015), determina as diretrizes nacionais diagnósticas e terapêuticas do câncer de cabeça e pescoço, mais especificamente, do carcinoma epidermoide.

Esta diz que as principais modalidades terapêuticas são a cirurgia e a radioterapia, com o objetivo de eliminar a doença do local original e da rede de drenagem linfática próxima ao tumor. Já a cirurgia permite o estadiamento histopatológico, determinação do grau de disseminação do tumor, evitando contatos desnecessários com radiação para o caso em que esta não for considerada um adjuvante a ser empregado, visto que o principal desafio desta técnica é a necessidade de aplicação de doses de radiação relativamente altas em tumores próximos a estruturas críticas, como a base do crânio, a medula espinhal e o aparato óptico. A radiação pode afetar a qualidade de vida do paciente, lesionando estruturas responsáveis por funções como a audição, fala e deglutição.

Outro tipo de tratamento que pode ser empregado é a utilização de adjuvantes locais (Ramineni *et al.*, 2013a), visto que com frequência a ressecção de regiões com displasia pode, assim como a radioterapia, resultar em sequelas tanto estéticas quanto funcionais, afetando a capacidade de engolir e a movimentação de membros, devido à perda ou comprometimento de tecidos essenciais (Desai *et al.*, 2011).

Quanto ao tratamento utilizando adjuvantes locais, a American Cancer Society (2017) enumera diversas possíveis drogas comumente recomendadas para este tratamento. Estas drogas pertencem a duas possíveis categorias: a de quimioterápicos tópicos e a de modificadores de resposta imune.

A quimioterapia tópica utiliza drogas capazes de matar as células cancerígenas. Neste caso, um fármaco antineoplásico é colocado em contato direto com a região afetada (geralmente na forma de creme ou unguento), e as principais drogas deste tipo são o 5-fluorouracil, o diclofenaco e o ingenol mebutato. Já os modificadores de resposta imune são drogas capazes de aumentar a resposta imunológica do organismo ao câncer que lhe acomete, e as drogas mais utilizadas são o imiquimode e o interferon. A ação destas drogas e suas respectivas categorias foram sumarizadas na Tabela 1.

Como o imiquimode apresenta amplo embasamento literário e uso clínico suficientemente longo, e possui um mecanismo de ação indireta bastante eficaz, com poucos efeitos colaterais, esta foi a droga escolhida para ser utilizada neste trabalho.

Tabela 1 – Principais adjuvantes sistêmicos utilizados no tratamento de carcinoma

epidermoide (American Cancer Society, 2017).

Categoria	Droga	Ação	Efeitos colaterais
Quimioterapia tópica	5-Fluorouracil	Mata as células tumorais próximas da superfície de contato, mas não consegue atingir células mais profundas no tecido.	Difícil absorção por camadas inferiores à epitelial. Eritema e sensibilidade.
<i>Peeling</i> químico	Ácido tricloroacético	Aplicação direta no tumor de pele, eliminando-o em alguns dias.	Queimaduras leves, irritação e eritema.
Modificador de resposta imune	Imiquimode	Faz com que o sistema imune reaja à lesão da pele e a elimine.	Irritação na derme e sintomas comuns à gripe.
	Interferon	Versão sintética de uma proteína do sistema imune que pode ser injetada diretamente no tumor, de modo a aumentar a resposta imune contra ele.	Vermelhidão e dor no local, boca seca, alergia, coceira, tontura e dores no estômago.

2.2 Incorporação de fármacos em matrizes poliméricas

Os agentes bioativos utilizados para o tratamento de câncer são comumente comercializados na forma de soluções a serem adicionadas ao soro durante a sessão de quimioterapia, ou ainda na forma de cremes, géis e unguentos. Estes meios de veiculação trazem consigo a problemática inerente de generalização do meio a ser utilizado para as soluções, e problemas de fixação local para géis e unguentos, principalmente quando estes precisam ser administrados em regiões úmidas, como o interior da boca e mucosas genitais.

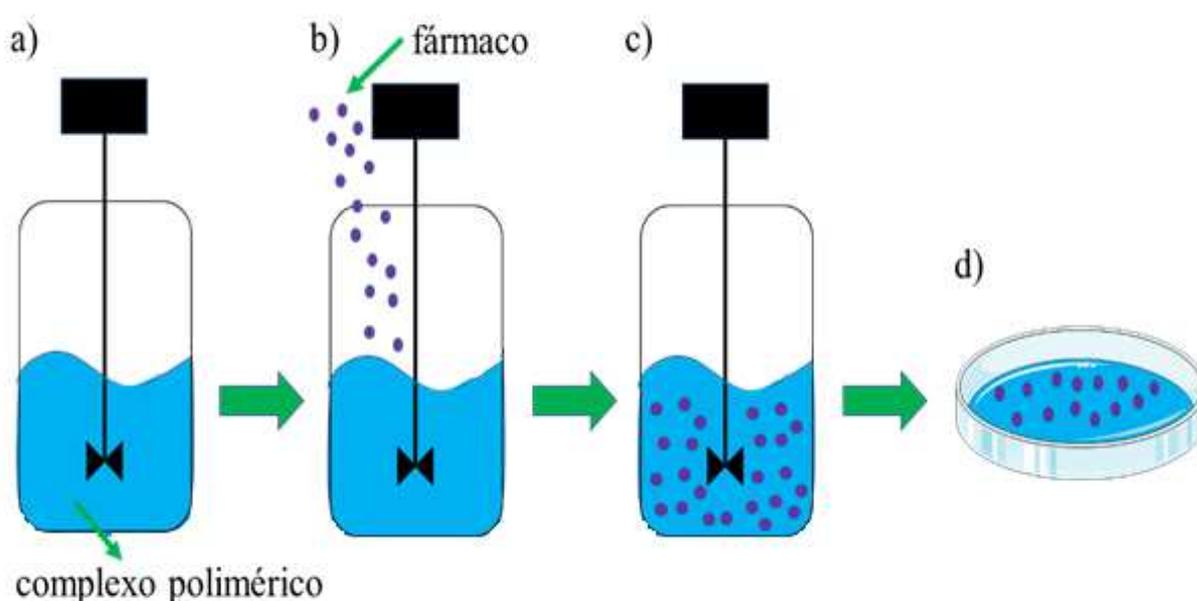
Assim, a utilização de dispositivos poliméricos como matrizes de incorporação para estes agentes bioativos tem possibilitado a obtenção de novos produtos para aplicação nas áreas farmacêuticas e médicas. Um exemplo desta forma de aplicação é o Zoladex[®] LA (AstraZeneca do Brasil Ltda), um implante subcutâneo que contém o fármaco acetato de goserelina disperso em uma matriz de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) que é biodegradada e eliminada do organismo após controlar a liberação do fármaco por 3 meses (Villanova, Oréfice e Cunha, 2010). Mais correlacionado ainda a este trabalho são os adesivos transdérmicos do tipo matricial utilizados para a reposição hormonal, como o System[®], que é constituído de um filme adesivo acrílico acoplado a um filme de poliéster e goma guar contendo estradiol (Corson, 1993).

Em uma membrana polimérica, tanto a eficiência de incorporação de um fármaco quanto a sua taxa de liberação depende da quantidade de droga adicionada, da solubilidade desta na matriz polimérica e do grau de homogeneidade da dispersão.

Os fármacos podem ser incorporados nas matrizes poliméricas de diversas maneiras diferentes, em diversas etapas do processo de produção, tais como por adição direta da droga à solução polimérica, antes da formação do filme, por impregnação a úmido (a matriz polimérica já conformada em membranas absorve uma solução concentrada de agente ativo), mediada por fluidos supercríticos (Braga *et al.*, 2008; Girata, 2011; Grassi e Grassi, 2005) e ainda por meio de processos envolvendo a ligação química da droga aos componentes da matriz polimérica.

Devido à baixa solubilidade do imiquimode em soluções aquosas, o alto custo relacionado à técnica de impregnação por fluidos supercríticos e a facilidade de incorporação do fármaco na matriz por adição direta deste quando na forma de pó fino, esta seria a técnica supostamente mais apropriada para a aplicação em questão, a qual pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática das etapas de incorporação do fármaco em dispositivos de liberação por adição direta durante o processo de produção da matriz polimérica: a) mistura das soluções poliméricas, b) adição do fármaco, c) dispersão do fármaco no complexo polimérico e d) filme polimérico seco com o fármaco incorporado (baseado em Pires, 2017).



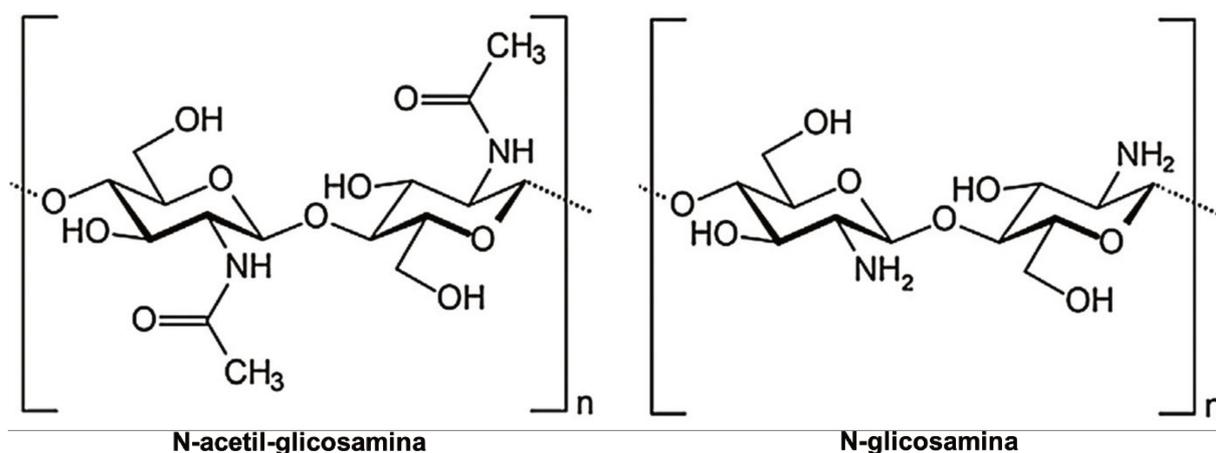
Como no presente caso as matrizes poliméricas nas quais o imiquimode foi

incorporado por meio de adição direta são compostas dos polissacarídeos quitosana e alginato, estes são abordados a seguir.

2.2.1 Quitosana

A quitosana, cuja estrutura química está representada na Figura 2, é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação alcalina do homopolímero linear quitina, encontrado no exoesqueleto de crustáceos, insetos e ainda na parede celular de alguns fungos. A quitosana é um copolímero policatiônico formado por unidades de N-acetil-glicosamina e N-glicosamina aleatoriamente distribuídas ou em blocos através da cadeia, dependendo do método de processamento utilizado para se produzir o biopolímero, sendo majoritariamente composta por N-glicosamina (fração mínima de 50%) (Khor e Lim, 2003).

Figura 2 – Estrutura química da quitosana (adaptada de LogithKumar *et al.*, 2016)



É bastante conhecida por suas propriedades antimicrobianas devido aos grupamentos amina presentes em sua estrutura (Chung e Chen, 2008). Este composto acelera a cicatrização de feridas e possui propriedade mucoadesiva devido à atração eletrostática da quitosana, quando positivamente carregada, pelas glicoproteínas presentes no muco (Kulkarni *et al.*, 2016).

Visto que o uso da quitosana oriunda de crustáceos pode ser problemático no caso de pacientes alérgicos a frutos do mar pode-se, opcionalmente, utilizar quitosana de origem fúngica, obtida a partir do cultivo de fungos pré-selecionados (Pochanavanich e Suntornsuk, 2002). A quitosana fúngica apresenta menor variação em propriedades como a distribuição da massa molar, mas atualmente é ainda pouco competitiva comercialmente, apresentando alto

custo.

Comercialmente, é possível encontrar alguns produtos na área de curativos para uso em lesões de pele que apresentam quitosana em sua constituição, como o ChitoGauze e o GuardaCare, que apresentam atividade hemostática e são produzidos pela HemCon[®], e o KytoCel, produzido pela Aspen Medical, composto primariamente de fibras de quitosana.

Não foram localizados relatos de produtos de uso comercial que utilizem quitosana para o tratamento de lesões tumorais bucais, verificando-se, portanto, uma relevante oportunidade de desenvolvimento de biomateriais visando tal aplicação.

No entanto, a literatura é repleta de abordagens de utilização da quitosana como veículo mucoadesivo de liberação local para lesões orais, tanto isolada quanto combinada a outros polímeros, nas mais diversas formas, como filmes mucoadesivos bucais (Abruzzo *et al.*, 2012, 2013; Ramineni, 2014), hidrogéis (Xu *et al.*, 2015), partículas (Anbinder *et al.*, 2011; Denora *et al.*, 2016; Giunchedi *et al.*, 2002; Sabitha, Vijaya Ratna e Ravindra Reddy, 2010) e comprimidos (Müller *et al.*, 2013).

2.2.2 Alginato

O alginato é um copolímero aniônico formado pelos grupos (1,4) β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G), como pode ser visto na Figura 3. É costumeiramente extraído de algas marrons e normalmente comercializado na forma de sal de sódio, sendo extensivamente estudado e usado para diversas aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e custo relativamente baixo. No entanto, são sua capacidade de sofrer reticulação sua sensibilidade ao pH e sua mucoadesão que, atualmente, têm sido as razões de atração deste polímero nas aplicações biomédicas (Agüero *et al.*, 2017).

Acredita-se que apenas os blocos do grupo G do alginato são responsáveis pela reticulação intermolecular que este é capaz de realizar com cátions divalentes de modo a formar hidrogéis (George e Abraham, 2006), visto que a ligação deste bloco é biaxial e resulta em cavidades que funcionam como sítios de ligação para estes íons e zonas de reticulação na rede do gel, como visto na Figura 4 (Smidsrød *et al.*, 1990). Segundo Kesavan, Nath e Pandit (2010) e Haugstad *et al.* (2015), este polímero é classificado como um bom agente mucoadesivo.

Curativos compostos de alginato já têm uso consolidado no mercado (Goh, Heng e Chan, 2012). Estes mantêm o microambiente fisiologicamente úmido, minimizando a infecção bacteriana no local da ferida e auxilia na cura de lesões (Lee e Mooney, 2012).

Trata-se de um polissacarídeo linear e aniônico que, em pH acima de aproximadamente 4, apresenta cargas negativas, enquanto que para valores inferiores, os grupos carboxilas permanecem na forma não ionizada, resultando em uma estrutura insolúvel do polímero (Agüero *et al.*, 2017).

Figura 3 – Estrutura química dos blocos G, M e de blocos alternados no alginato (adaptado de Lee e Mooney, 2012).

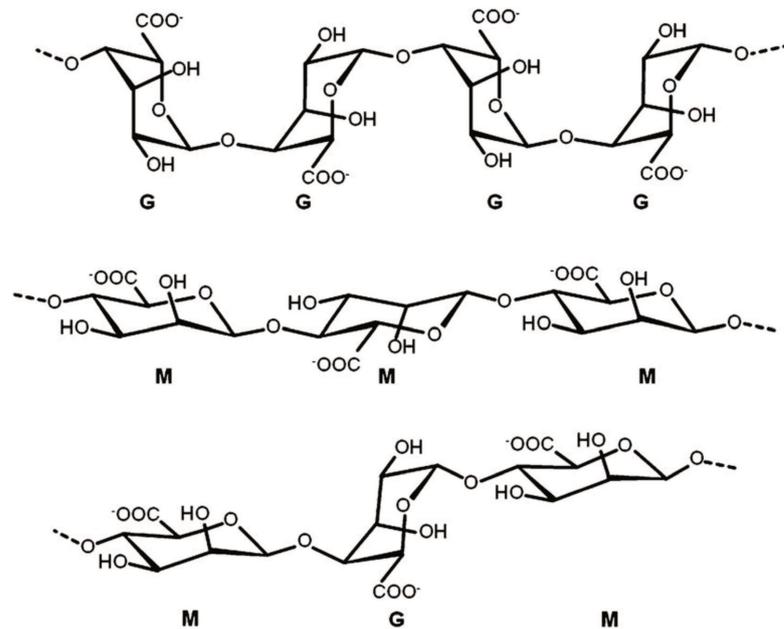
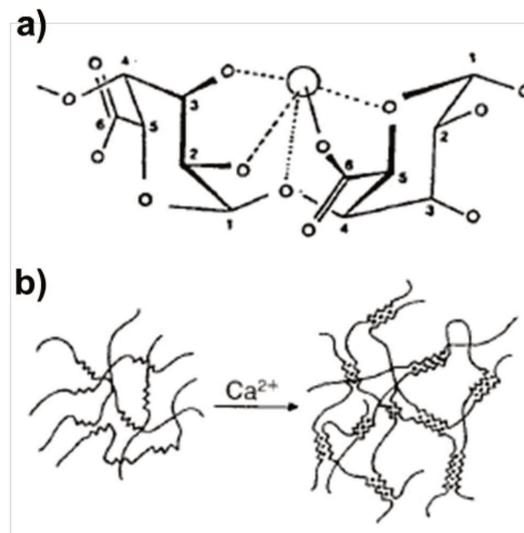


Figura 4 – Ligação do íon bivalente ao bloco G do alginato (a) e formação do gel de alginato reticulado (b) (adaptado de Smidsrød *et al.*, 1990).



Alguns exemplos comercialmente disponíveis de dispositivos produzidos com alginato

para o tratamento de lesões de pele atualmente são os curativos Cutimed Alginate produzido pela BSN Medical, composto em 80% por alginato de cálcio e 20% por alginato de sódio; o Alginate CMC Dressings produzido pela ReliaMed, constituído de uma blenda de alginato de cálcio e de carboximetil celulose (CMC); Curatec Hidrogel com Alginato, da Curatec, um gel composto de alginato de cálcio e sódio, CMC, propilenoglicol e água purificada.

Assim como para a quitosana, também não foram encontrados relatos de produtos de uso comercial que utilizem alginato para o tratamento de lesões tumorais bucais, mas a literatura apresenta diversos relatos de estudos da incorporação de fármaco em formulações contendo alginato (Anbinder *et al.*, 2011; Sankalia *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2017).

2.2.3 Complexos Polieletrólitos (PEC)

Complexos poliméricos são formados através da associação de um ou mais polímeros complementares, a qual pode decorrer de forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals ou combinações dessas interações. A formação destes complexos pode alterar drasticamente a solubilidade, reologia, condutividade elétrica e turbidez das soluções poliméricas (Lee *et al.*, 1999).

Particularmente, complexos polieletrólitos (PECs) são uma subcategoria dos complexos poliméricos, formados através da reação de polieletrólitos de cargas opostas em solução aquosa. Como a quitosana e o alginato apresentam cargas opostas em condições de pH intermediárias aos valores dos pKas de seus grupamentos ionizáveis, um PEC pode ser formado através do mecanismo de atração eletrostática, com o carboxilato presente no alginato interagindo ionicamente com a amina protonada da quitosana, formando um complexo de carga neutra, com tendência de intumescimento superior à da quitosana sozinha, mas inferior à do alginato, e com maior resistência e estabilidade quanto à biodegradação que o alginato isolado (Li *et al.*, 2009).

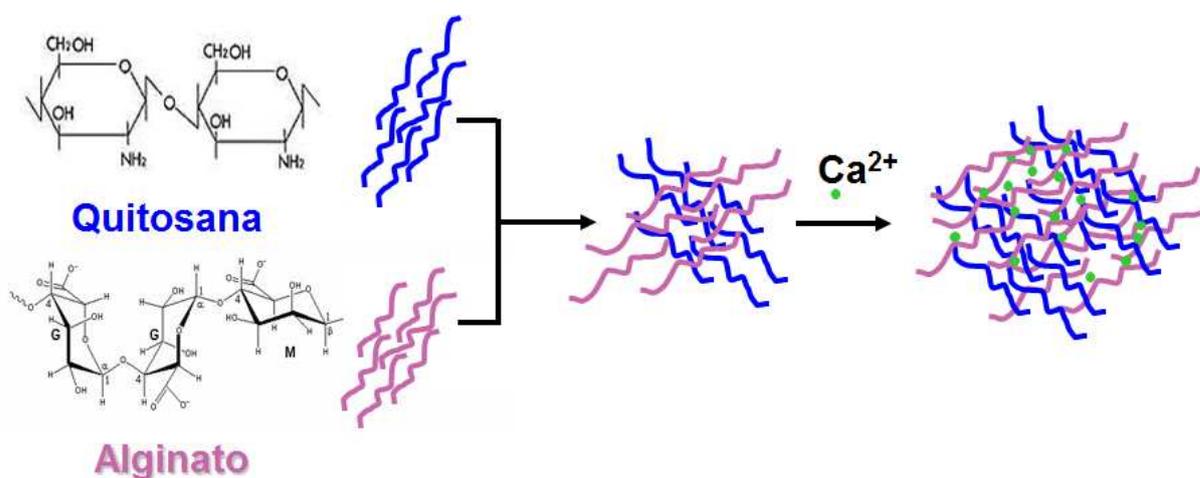
É importante notar que, após a formação do PEC de quitosana e alginato, diversas das propriedades supracitadas de ambos os polímeros são mantidas. O PEC apresenta ainda maior estabilidade a variações no pH e maior eficiência na liberação controlada de princípios ativos (Yan, Khor e Lim, 2000). No entanto, tem-se perda da atividade antimicrobiana devido ao bloqueio das aminas da quitosana por sua associação com as carboxilas do alginato (Rodrigues *et al.*, 2008).

Segundo Caetano *et al.* (2015) e Pires (2017), filmes lamelares compostos deste PEC apresentam alto potencial para utilização como curativos primários em lesões de pele, de

acordo com resultados de ensaios *in vivo* realizados.

Uma das técnicas de obtenção deste complexo na forma de filmes de QA foi originalmente proposta por Yan, Khor e Lim (2000) e adaptada por Wang *et al.* (2001 e 2002) e Rodrigues *et al.* (2008), visando, principalmente aplicações na área de saúde. Para isso, as condições de processamento, tais como concentração dos polímeros e taxa de agitação da mistura, são alguns dos fatores a serem modificados de acordo com o local de aplicação do complexo. Segundo Berger *et al.* (2004), este PEC pode ainda sofrer reticulações iônicas adicionais através da ação de íons bivalentes como o cálcio (Ca^{2+}), conforme mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Formação do complexo polieletrólito pela interação de quitosana e alginato e reticulação das carboxilas remanescentes do alginato por íons cálcio.



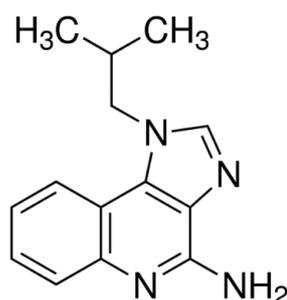
É possível encontrar na literatura um extenso repertório de exemplos de compostos incorporados em complexos poliméricos de diferentes composições. Rodrigues *et al.* (2008) incorporaram o antibiótico bacitracina em membranas de quitosana e alginato, enquanto Souza, Souza e Moraes (2016) a eritromicina, também neste tipo de complexo, com eficiências relativamente baixas para ambos os casos. Abruzzo *et al.* (2012) realizaram a produção de PECs compostos de quitosana e gelatina tipo B, eficientemente incorporando neste o hidrocloreto de propranolol, Girata (2011) e Pires (2013) produziram membranas de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata (AlphaSan[®] RC2000) enquanto Pires (2017) produziu membranas de quitosana e alginato contendo extrato padronizado de *Arrabidaea chica* Verlot.

2.3 Imiquimode e seu mecanismo de ação

O agente antineoplásico denominado imiquimode é uma imidazoquinolina modificadora de resposta imunológica, utilizado de maneira eficaz no tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular superficial (Micali *et al.*, 2014). Esta droga encontra-se no estado sólido à temperatura de 25°C e possui elevada estabilidade térmica, degradando a temperaturas superiores a 292°C (Ramineni *et al.*, 2013a), e à exposição a luz, apresentando, entretanto, solubilidade limitada em soluções aquosas. Sua estrutura molecular pode ser observada na Figura 6.

Este composto apresenta massa molar de aproximadamente 240,30 g/mol e pKa igual a 7,3 (Chollet *et al.*, 1999). É importante ainda explicitar que o imiquimode pode atuar como doador ou aceptor em ligações de hidrogênio, fazendo, respectivamente uma e três ligações destas categorias (Pubchem, 2017).

Figura 6 – Fórmula estrutural do imiquimode (Sigma-Aldrich, 2017).

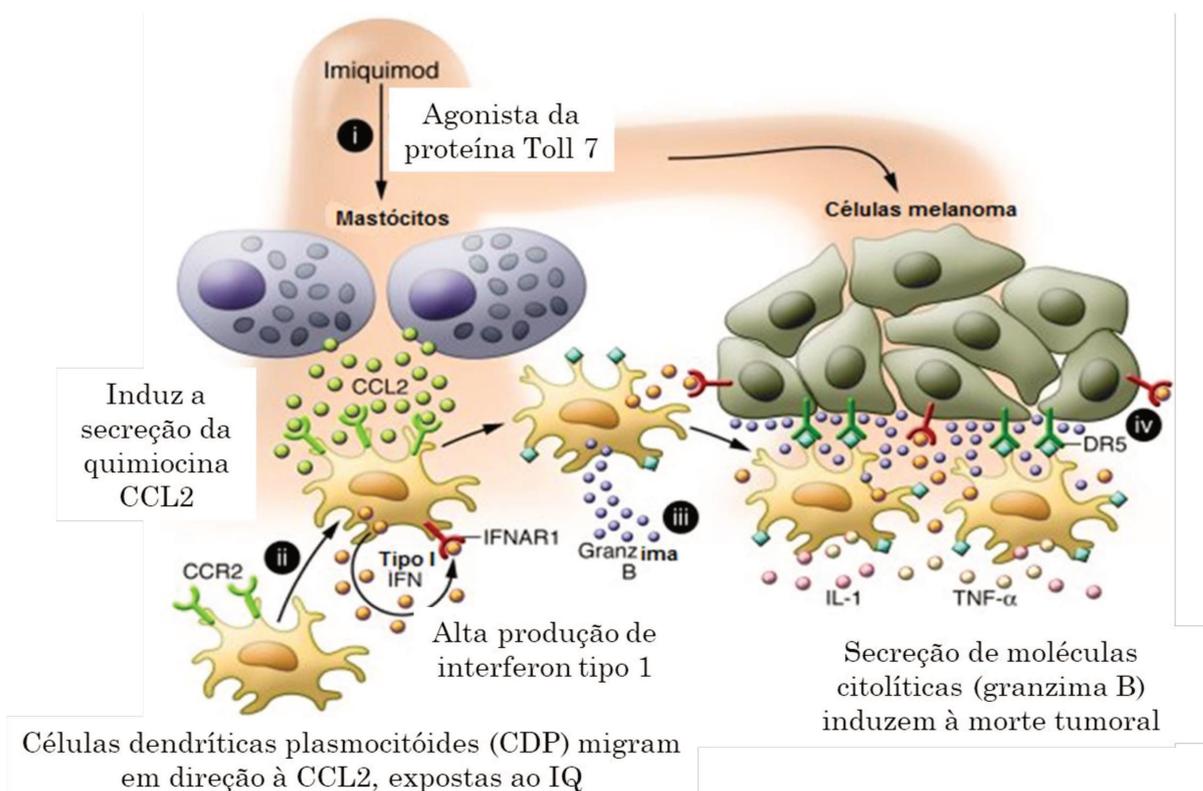


Micali *et al.* (2014) discutem o mecanismo de atuação do imiquimode em tumores de pele, onde este fármaco desencadeia uma série de eventos ao agir sobre os receptores do tipo Toll (TLRs), localizados na superfície de células com antígenos presentes, como monócitos, macrófagos e outras. O imiquimode age como um potente agonista dos TLRs-7 e 8 (Figura 7, etapa i), levando à ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), um fator de transcrição central. Esses TLRs liberam estímulos através de sinais que resultam na produção e liberação de diversas citocinas endógenas e quimiocinas (Figura 7, etapa ii), como os interferons gama (IFN-γ) e alfa (IFN-α), o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), as interleucinas (ILs) 6, 1a, 1b, 8 e 12 e os fatores de estimulação de colônias de macrófagos granulócitos (Figura 7, etapa iii), os quais estimulam respostas de maneira inata e imuno-adquiridas, resultando em atividade antitumoral (Figura 7, etapa iv). Estes eventos e suas interligações podem ser visualizados em conjunto, de forma esquemática, na Figura 7.

Este composto já foi incorporado com sucesso em bioadesivos formados por blendas poliméricas do copolímero PMVE/MA (poli(metil vinil éter-co-anidrido maleico)) com plastificantes por Donnelly *et al.* (2006), filmes de blendas de poli(vinilpirrolidona) (PVP) e carboximetilcelulose (CMC) por (Ramineni *et al.*, 2014), nanopartículas de lipídios sólidos por Patel e Patel (2013) e ainda em micelas à base de ácido polilático por Jimenez-Sanchez *et al.* (2014). No entanto observa-se a presença de uma lacuna na literatura no que se refere à sua incorporação em matrizes feitas exclusivamente de polissacarídeos.

O imiquimode é o princípio ativo de diversos cremes disponíveis comercialmente para tratamento de tumores de pele, como o Aldara[®], Zyclara[®] e o Modik[®], estando presente nas formulações em proporções de droga variando de 2,5 a 5% em massa da composição, para utilização em regiões diversas da pele e ainda intravaginais, sendo aplicado 5 vezes por semana na hora de dormir por seis semanas completas, em quantidades suficientes para cobrir a área de tratamento, com margem de 1 cm ao redor do tumor. O creme deve ficar em contato com a lesão por aproximadamente 8 horas, sendo então removido com água e sabão (Medicis Pharmaceutical Corp, 2014).

Figura 7 – Mecanismo de ação do Imiquimode em células de melanoma (adaptado de Jiménez-Baranda, Silva e Bhardwaj, 2012).



Este creme não é indicado para utilização intraoral, devido à contínua reposição de saliva que remove o medicamento do local da aplicação por lavagem, resultando em baixo tempo de residência da droga, com conseqüente redução da eficácia do tratamento. Entretanto, esta droga vem sendo utilizada com sucesso no tratamento desta e de outras neoplasias para as quais não é indicado originalmente em sua bula, o que tem motivado pesquisadores como Ahn *et al.* (2012) a explorar esta via. Estes autores mostram que o imiquimode inibe o crescimento do carcinoma de células escamosas através da indução à apoptose e necrose destas, demonstrando o potencial desta droga para o combate deste tipo de neoplasia também quando localizada na região oral. Assim, de modo a suprir a limitação de lavagem com a saliva, ao menos em parte, optou-se no presente trabalho pelo uso de dispositivos mucoadesivos de liberação controlada contendo o referido fármaco, de modo a assim abranger áreas adicionais afetadas por este tipo de câncer.

2.4 Sistemas mucoadesivos para a liberação localizada de fármacos

Como já mencionado, a escolha do sistema mucoadesivo provém de suas diversas vantagens na liberação controlada em tecidos úmidos como os orais e os genitais, visto que possibilita o prolongamento do tempo de residência da droga no local específico desejado, ao propiciar o contato direto entre o sistema e a mucosa absorviva, resultando em um alto fluxo da droga no tecido-alvo (Boddupalli *et al.*, 2010).

Salamat-Miller, Chittchang e Johnston (2005) elencam os principais polímeros que possuem características mucoadesivas, entre eles o alginato e a quitosana. A mucoadesão dá-se por um mecanismo dividido em duas etapas, o estágio de contato e o de consolidação. A primeira é caracterizada pelo contato do sistema com a membrana mucosa, através do espalhamento e intumescimento do material aplicado sobre a mucosa; já a segunda refere-se à interpenetração das cadeias poliméricas na camada mucosa e à ocorrência de ligações entre elas. A umidade plastifica o dispositivo, que consegue se ligar a glicoproteínas do muco por forças fracas de van der Waals ou ligações de hidrogênio (Boddupalli *et al.*, 2010).

Segundo Thie *et al.* (2002), adultos normais produzem diariamente de 0,5 a 1,0 L de saliva, com taxa aproximada de 0,4 mL/min, fornecendo constantemente fluido fresco à região bucal. Isto possibilita a manutenção de gradientes de concentração relativamente elevados, que atuam como considerável força motriz para a liberação, nesta região, de fármacos incorporados em dispositivos poliméricos mucoadesivos, o que torna a utilização do sistema proposto por este trabalho na região bucal bastante atrativa, e reforça essa escolha.

No entanto, uma limitação desta abordagem é apontada por Salamat-Miller, Chittchang e Johnston (2005): a reticulação das cadeias poliméricas formadoras da matriz de incorporação do fármaco diminui a taxa de difusão de água para seu interior, dificultando seu intumescimento, reduzindo, assim, a interação entre a matriz e o muco, podendo, desta forma, diminuir a capacidade mucoadesiva do material.

Devido a este motivo, deve ser considerada a possibilidade de o polieletrólito formado pela quitosana e pelo alginato apresentar capacidade mucoadesiva inferior à de seus componentes isolados.

Para testar a mucoadesividade do material produzido existem duas abordagens genéricas: a reológica e a baseada na tensão de ruptura. A primeira trata da alteração de propriedades reológicas como viscosidade e viscoelasticidade do polímero mucoadesivo quando misturado ao muco, devido ao intertravamento de cadeias, modificações conformacionais e ainda interações químicas entre eles. Este pode ser avaliado por turbidimetria, visto que a interação entre o muco e o polímero resulta em alteração na turbidez da suspensão (Caramella *et al.*, 2015).

Já o segundo método fundamenta-se na análise da tensão de ruptura, ou seja, da força necessária para que a amostra se separe de um substrato biológico que apresente características de mucosa, em função do deslocamento ocasionado na interface mucoadesiva (Caramella *et al.*, 2015). Esta abordagem, no âmbito deste trabalho, em teoria, seria a mais representativa, uma vez que o sistema de liberação é composto de membranas sólidas.

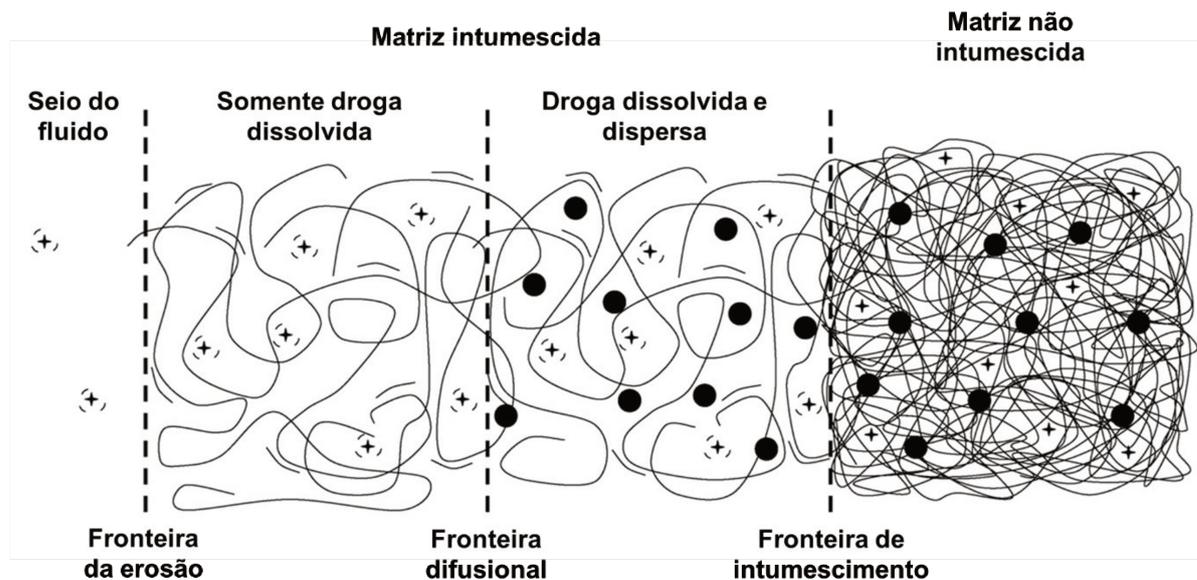
A utilização de sistemas poliméricos com capacidade mucoadesiva é bastante estudada, para as mais diversas aplicações. Desai *et al.* (2011) incorporaram, com bons resultados, a droga fenretinide em uma matriz polimérica de Eudragit® (co-polímeros derivados de ésteres de ácido acrílico e metacrílico) para possível uso no tratamento de CCE oral. Cubayachi *et al.* (2015) produziram um sistema polimérico composto de hidropropilmetilcelulose (HPMC) contendo cloridrato de prilocaína e cloridrato de lidocaína, atingindo com promissores resultados a produção de uma anestesia bucal sem agulha. Ramineni *et al.* (2013b) descrevem produção de uma blenda polimérica composta de poli(vinilpirrolidona) (PVP K-90) e carboximetilcelulose (CMC) em diferentes proporções (1:2 e 2:1) com o antineoplásico imiquimode incorporado para o tratamento de displasias orais, com bons resultados de mucoadesão e liberação.

Tendo garantidas as propriedades de mucoadesão do sistema proposto, este já com a droga incorporada, é necessário entender o mecanismo desta liberação, o qual será discutido a seguir.

2.5 Mecanismos de liberação controlada de fármacos incorporados em matrizes poliméricas

O tipo e a quantidade de droga incorporada, a quantidade de soluções excipientes, a técnica de preparação utilizada, a geometria do material produzido são alguns dos fatores que podem influenciar os fenômenos envolvidos no controle da liberação da droga. Alguns destes fenômenos incluem a dissolução, a partição, a difusão e a osmose do fármaco na matriz, o intumescimento, a erosão e a degradação do dispositivo de liberação (Siepmann e Siepmann, 2012), os quais estão representados na Figura 8.

Figura 8 – Representação esquemática da liberação controlada pelo intumescimento e erosão da matriz polimérica e pela dissolução de difusão do fármaco, onde o fármaco solubilizado está representado por (+) e o precipitado por (●) (adaptada de Siepmann e Siepmann, 2012).



Para a análise do desempenho do sistema de liberação desenvolvido, diversos modelos matemáticos podem ser encontrados na literatura. Siepmann e Siepmann (2008) compilaram vários destes de maneira bastante abrangente. O modelo proposto por Peppas (1985) é, costumeiramente, um dos primeiros a ser testado, como equação diagnóstica, visto que se trata de uma equação semi-empírica, bastante simples, mas capaz de descrever de forma adequada variados comportamentos de liberação de fármacos a partir de dispositivos poliméricos como os desenvolvidos neste trabalho. Este modelo é conhecido por *power law* (lei das potências).

Outro modelo bastante importante, o de Peppas e Sahlin (1989) considera a liberação da droga da matriz polimérica como sendo a soma proveniente da liberação de uma componente difusiva (Fickiana) e uma componente relacionada à contribuição de relaxamento da estrutura da matriz após seu intumescimento. Este e outros modelos comumente encontrados na literatura estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Exemplos de modelos matemáticos encontrados na literatura (adaptado de Cardoso Da Costa e Costa, 2002; Peppas e Sahlin, 1989; Siepmann e Siepmann, 2008).

Modelos	Equações
Ordem zero	$M_t = M_0 + k_0 t$
Ordem um	$\ln M_t = \ln M_0 + k_1 t$
Ordem dois	$\frac{M_t}{M_\infty} (M_\infty - M_t) = k_2 t$
Hixson Crowell	$M_0^{1/3} - M_t^{1/3} = k_s t$
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n$
Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^{2n}$
Higuchi	$M_t = k_H \sqrt{t}$
Quadrático	$M_t = 100(k_1 t^2 + k_2 t)$
Hopfenberg	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{k_0 t}{C_0 a_0}\right)^n$

onde M_t , M_0 e M_∞ são as massas totais acumuladas de droga liberadas no tempo t , no tempo inicial e no tempo infinito, respectivamente; k , k_0 , k_1 , k_2 , k_H , k_s são constantes características do dispositivo, dependentes de sua estrutura e geometria; n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação da droga, C_0 é a concentração inicial do fármaco na matriz e a_0 é o raio inicial para esferas e cilindros e metade da espessura para sistemas planos.

O modelo de Peppas (1985) é particularmente útil na etapa de averiguação inicial dos mecanismos responsáveis pela transferência do agente bioativo incorporado na matriz polimérica para os fluidos do meio biológico, por análise comparativa do valor do parâmetro n a dados de referência. No caso de filmes finos, quando o expoente n assume valor 1, a taxa de liberação da droga é independente do tempo, ou seja, verifica-se cinética de ordem zero, controlada pelo intumescimento da membrana. Já quando n assume o valor de 0,5 supõe-se que a liberação ocorra por difusão, seguindo a lei de Fick. Para valores inferiores a 0,5 o

mecanismo de liberação é chamado de *quasi-Fickiano*, em que a difusão se dá parcialmente pela matriz e parcialmente pelos poros da matriz intumescida pelo fluido (Ritger e Peppas, 1987a; b). Se o valor de n for superior a um, tem-se o denominado Supercaso II, no qual se verifica a ocorrência de mecanismos de transporte associados a estresse da matriz polimérica, por exemplo, devido a mudanças de estado, intumescimento, desenovelamento de cadeias poliméricas e erosão.

A partir da aplicação deste modelo e da identificação do mecanismo mais provável de liberação pode-se, então, testar ou desenvolver modelos matemáticos mais específicos e elucidar, com maior nível de detalhamento, as características dos dispositivos produzidos, prevendo-se com quais formulações seria possível se atingir as metas propostas de liberação em termos de tempo de atuação e concentração de fármaco disponibilizado.

2.6 Considerações Finais

Segundo Micali *et al.* (2014), o imiquimode é utilizado com sucesso sob aprovação do Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos desde 1997 para tratamento, na forma de creme de uso tópico, de neoplasias na pele. No entanto, apresenta alguns efeitos colaterais desagradáveis, como irritação do local, inchaço, vermelhidão, até alergia aguda, o que abre espaço para outros possíveis veículos de liberação da droga, como os filmes polissacarídicos.

Ahn *et al.* (2012) mostraram que o imiquimode pode ser considerado um fármaco terapêutico efetivo também no tratamento de carcinoma de células escamosas orais (CEO), e não só de pele, inibindo a proliferação celular e induzindo processos de apoptose e necrose. Nesse estudo foram utilizadas linhagens de CEO humano dos tipos YD-10B e FaDu, e como o único relato encontrado da utilização desta droga diretamente em lesões bucais envolvia a pomada comercializada Aldara® (Ramineni *et al.*, 2013a), com resultados positivos, optou-se por considerá-la como referencial para as estimativas iniciais de quantidade de droga a ser incorporada e liberada dos filmes.

Desta maneira, pode-se supor que caso a membrana apresente a mesma liberação que o creme, esta provavelmente seria terapeuticamente satisfatória. No entanto, é importante mencionar que a mucosa bucal apresenta permeabilidade de 4 a 4000 vezes maior que a pele (Ramineni *et al.*, 2013b), logo, uma dose menor pode ser já suficiente para se atingir os resultados desejados para esse alvo.

Visto que a o imiquimode possui uma literatura extensa tanto de pesquisa quanto de

aplicação médica consolidada para tratamentos de pele, na forma de creme, a inovação deste trabalho vem da alteração do veículo de liberação e possível redução dos efeitos colaterais provenientes da interação direta da droga em alta dose aplicada topicamente, como alergias e irritações na pele.

Considerando que há a disponibilidade de um número limitado de formulações aplicáveis em lesões orais, que a maior parte destas se refere a condições dermatológicas, esta torna-se a maior inovação deste trabalho. Dentre os problemas relacionados à utilização de fármacos na região bucal estão incluídos fatores como a degradação enzimática, sabor eventualmente desagradável do fármaco e do dispositivo de liberação, além de pouca disponibilidade de área superficial para contato, reduzida penetração do fármaco na lesão e mesmo a possibilidade de ingestão acidental do dispositivo (Sankar *et al.*, 2011). Nota-se, portanto que, há uma clara lacuna no desenvolvimento de biomateriais desta categoria para o tratamento de tumores nesta região, principalmente quando se considera a baixa solubilidade da droga e a diminuta biodisponibilidade na região-alvo que se pode alcançar por meio de formulações administradas por via oral.

Considerando-se também as dificuldades e oportunidades relacionadas à terapia local de carcinoma de células escamosas, o qual representa aproximadamente 90% dos casos de cânceres bucais, é desejável que seja desenvolvido um sistema por meio do qual o fármaco liberado penetre no tecido epitelial afetado e apresente um perfil de retenção otimizado, de modo a apresentar a menor perda possível na superfície ou tecido conectivo abaixo da lesão.

O tratamento local deste tipo de displasia oferece algumas vantagens, como sua acessibilidade, facilidade de administração, rápido reparo da mucosa oral, possibilidade de liberação sustentada e potencial de redução de efeitos colaterais sistêmicos. Adicionalmente, a terapia local pode ser combinada a outras formas de tratamento, como a quimioterapia sistêmica ou a irradiação. A abordagem de formulação proposta neste trabalho sustenta-se em todos estes pontos citados, com o objetivo de atingir uma eficaz e preferencial liberação do fármaco no tecido lesado.

Em suma, são observadas lacunas no que tange à utilização exclusiva de polissacarídeos, a exemplo da quitosana e do alginato, como constituintes da matriz de incorporação da droga imiquimode para aplicação tanto na pele, quanto principalmente, oral na forma de dispositivo mucoadesivo. Além disso, no desenvolvimento bem-sucedido de tais dispositivos, parâmetros críticos específicos devem ser atendidos tais como resistência, estabilidade, aparência, perfil de liberação da droga, umidade residual, características organolépticas e uniformidade da dose de fármaco, entre outros.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Foram empregados quitosana com grau de desacetilação de 82% (C3646, lote SLBL3564V e massa molar média de $1,26 \times 10^6$ g/mol, da Sigma-Aldrich), alginato de sódio de média viscosidade (A2033, lote 058K0126 massa molar média de $9,11 \times 10^4$ g/mol, da Sigma-Aldrich), ácido acético glacial, cloreto de cálcio dihidratado e hidróxido de sódio (Merck), cloreto de sódio (C1060.01.AH, lote 120164, Synth), cloreto de potássio (P5405, lote SLBC3868V, Sigma-Aldrich), cloreto de cálcio dihidratado (10035-04-8, lote K93404582, Sigma-Aldrich), cloreto de magnésio hexahidratado (M2393, lote SLBC4343V, Sigma-Aldrich), fosfato de sódio dibásico anidro (F2254.01.AH, lote 141330, Synth). O imiquimode (lote M626368, EMS) foi doado pela indústria farmacêutica EMS (Hortolândia, SP). A água deionizada foi obtida em sistema Milli-Q, da Millipore.

3.2 Métodos

Os ensaios descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides, no Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos e no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP e no Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP.

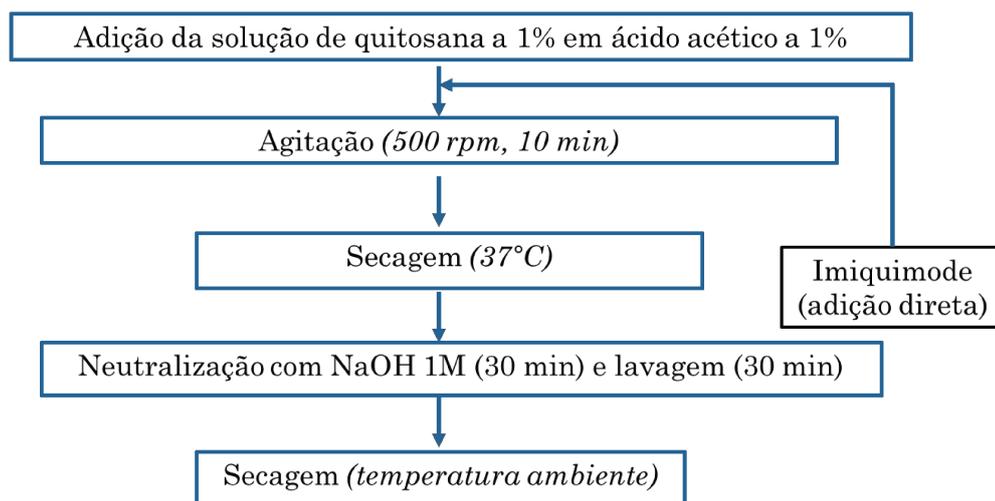
3.2.1 *Preparação das membranas*

Os procedimentos empregados foram baseados em modificações dos métodos desenvolvidos por Pires (2013), Camargo (2015) e Bierhalz e Moraes (2016). A metodologia experimental utilizada é descrita em detalhes a seguir.

As membranas produzidas a partir unicamente de quitosana foram preparadas utilizando 400 mL de solução aquosa do polissacarídeo a 1% (m/v) em ácido acético também a 1% (v/v), à qual também foi adicionado o fármaco (0,22 g) quando requerido. A mistura resultante foi então alíquotada em quatro placas de Petri de poliestireno de 15 cm de diâmetro, cada uma contendo aproximadamente 85 g da mistura final. O material obtido foi seco em

estufa com circulação de ar forçada a 37°C, neutralizado por exposição a 150 mL de solução aquosa de NaOH a 1 mol/L, lavado com 200 mL de água deionizada e novamente seco à temperatura ambiente. Este procedimento encontra-se sumarizado na Figura 9.

Figura 9 – Fluxograma de produção da membrana de quitosana.

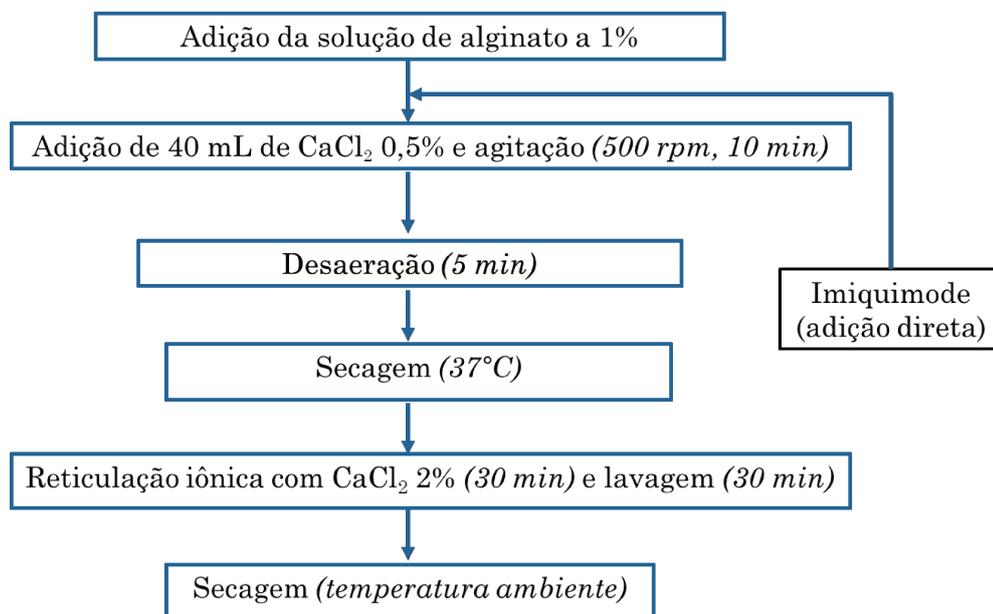


No caso de membranas constituídas somente de alginato, 400 mL de solução aquosa deste polissacarídeo a 1% (m/v) foram misturados primeiramente com o fármaco (quando necessário), e com 40 mL de CaCl₂ em solução aquosa de 0,5% (m/v) gotejadas na borda de um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm, sob constante agitação de 500 rpm. Alíquotas de aproximadamente 85 g do material foram devidamente transferidas para placas de Petri de poliestireno de 15 cm de diâmetro, secas a 37°C em estufa com circulação de ar forçado e reticuladas secundariamente por imersão em 150 mL de solução aquosa de CaCl₂ a 2% (m/v) por 30 minutos, lavadas duas vezes sucessivamente por imersão em 200 mL de água deionizada durante 30 minutos, e novamente secas à temperatura ambiente. A metodologia empregada na produção desta formulação está sumarizada na Figura 10.

As membranas de quitosana e alginato (QA) foram preparadas seguindo-se dois distintos procedimentos, o primeiro realizado em caráter exploratório, discriminado como QA 1:1 A, empregando-se solução de quitosana a 1% dissolvida em ácido acético a 2% e solução aquosa de alginato a 0,5%, com produção de duas membranas por batelada. No segundo procedimento, empregou-se solução aquosa de alginato a 1% e ácido acético a 1% para a dissolução da quitosana, visando minimizar a ocorrência de problemas associados com a acidez excessiva dos biomateriais nas etapas de ensaios biológicos. Este procedimento, para a

formulação QA 1:1, foi descrito como QA 1:1 B, tendo sido empregado com adaptações para as formulações restantes.

Figura 10 – Fluxograma de produção da membrana de alginato.



Assim, para a produção de membranas de QA, primeiramente, uma alíquota de 100 a 300 mL de solução aquosa de alginato de média viscosidade a 0,5% ou 1% (m/v) foi transferida para um reator de aço inoxidável encamisado, com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm, com temperatura controlada a 25°C por circulação de água termostatzada. Com o auxílio de uma bomba peristáltica (modelo Minipuls 3, Gilson) foram adicionados ao reator de 90 a 300 mL de solução de quitosana a 1% ou 2% (m/v) dissolvida em solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) sob constante agitação a 500 rpm, por meio de um agitador mecânico (251 D, Quimis), a uma vazão de 6 mL/min. Após toda a adição da solução de quitosana, as condições de agitação foram alteradas para 1000 rpm por 10 minutos.

O pH foi então corrigido para 7,0 através da adição lenta de 7,5 a 22,5 mL de solução de NaOH 2 mol/L com uma pipeta volumétrica. Novamente, após a adição de toda a solução, agitou-se a mistura por 10 minutos. Nos casos em que se desejava incorporar o fármaco às membranas, o composto foi adicionado após esta etapa, antes da reticulação, através da adição direta de 0,1 a 1,0 g de imiquimode.

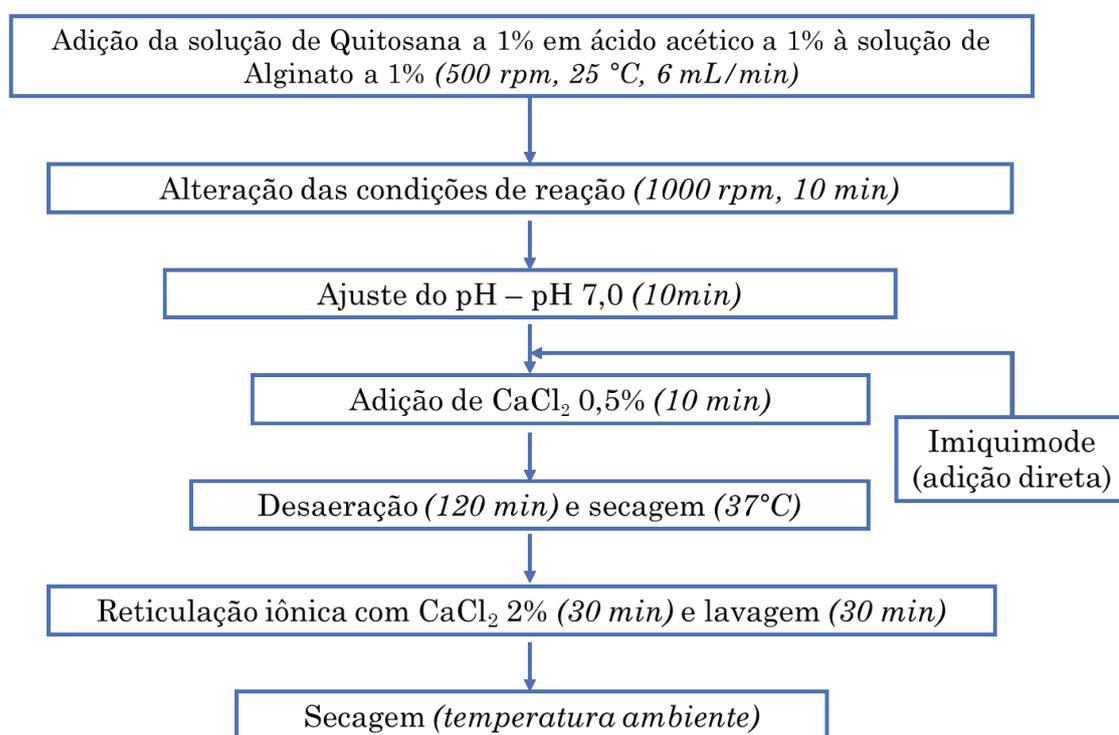
Uma primeira reticulação iônica foi realizada através da adição de 10 a 30 mL de solução aquosa de CaCl_2 a 0,5% (m/v) gotejada nas bordas do reator. Após a adição, a suspensão foi agitada por mais 10 minutos.

Finalmente, a agitação foi interrompida, e toda a solução foi vertida em um kitassato de 1 L, acoplado a um sistema de bomba a vácuo (Q-355B2, Quimis) para realizar a desaeração da suspensão por um período de 2 horas.

Após esse período, a suspensão resultante foi transferida para duas ou quatro placas de Petri de poliestireno de 15 cm de diâmetro (uma alíquota de 85 g por placa). As placas foram colocadas em estufa com circulação de ar forçado (modelo 410D, Nova Ética) a 37°C para que secassem por 24 horas.

Após este período, as membranas foram retiradas da estufa para a realização da reticulação secundária, imergindo-se cada membrana em 150 mL de solução aquosa de CaCl₂ a 2% (m/v) por 30 minutos. Após esse período duas lavagens sucessivas, feitas pela imersão das membranas em 200 mL de água deionizada foram realizadas, também por 30 min cada. O procedimento empregado na produção destas formulações foi sumarizado na Figura 11.

Figura 11 – Fluxograma de produção das membranas de quitosana e alginato (QA) nas razões mássicas Q:A de 1:1, 1:3 e 3:1.



Por fim, as membranas secaram à temperatura ambiente, também por 24 horas. Quando requerido, as membranas foram esterilizadas por exposição a óxido de etileno na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda. (Campinas, SP).

As amostras utilizadas nos ensaios de atividade biológica *in vitro* foram adicionalmente lavadas com 200 mL solução do tampão ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanolsulfônico (HEPES) a 10 mmol/L e pH 7,4 por 10 minutos e, em seguida, por uma lavagem com 500 mL de água deionizada. Estas foram então secas a temperatura ambiente por 24 horas.

As diferentes formulações produzidas pelo uso das diferentes técnicas experimentais estão sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Diferenças nas quantidades dos reagentes utilizados para a produção de duas a quatro membranas por lote contendo diferentes proporções mássicas dos polissacarídeos.

Formulação	Concentração da solução de polissacarídeo		Volume de solução de polissacarídeo		Volume de solução aquosa		Massa de imiquimode (g)
	Quitosana ^a (% m/v)	Alginato ^c (% m/v)	Quitosana (mL)	Alginato (mL)	NaOH 2 mol/L ^d (mL)	CaCl ₂ ^f 0,5% (mL)	
Quitosana	1,0	---	400	---	150 ^e	---	0,22
Alginato	---	1,0	---	400	---	40,0	0,22
QA 1:1 A	1,0 ^b	0,5	90	180	13,0	3,6 ^g	0,1 a 1,0
QA 1:1 B	1,0	1,0	200	200	15,0	20,0	0,22
QA 3:1	1,0	1,0	300	100	22,5	10,0	0,22
QA 1:3	1,0	1,0	100	300	7,5	30,0	0,22

a) Solução em ácido acético a 1% em volume, com exceção de b) solução em ácido acético a 2% em volume; c) solução aquosa; d) adição após a mistura de Q e A, com exceção de e); e) imersão do filme seco em solução; f) solução aquosa de CaCl₂ a 0,5% m/v, com exceção de g) solução aquosa de CaCl₂ a 2% em m/v.

3.2.2 Caracterização das membranas

A caracterização das membranas foi realizada conforme adaptações dos métodos descritos por Rodrigues *et al.* (2008), Bueno e Moraes (2011), Veiga e Moraes (2012), Veiga (2012), Bellini *et al.* (2012) e Pires (2013), exceto quando estabelecida outra referência. As membranas foram armazenadas em suas respectivas placas de poliestireno em condições ambientes, exceto quando diferentemente estabelecido.

3.2.2.1 Aspecto e morfologia da superfície

As membranas foram avaliadas por inspeção visual e seu aspecto observado a olho nu foi registrado por meio de fotografia digital.

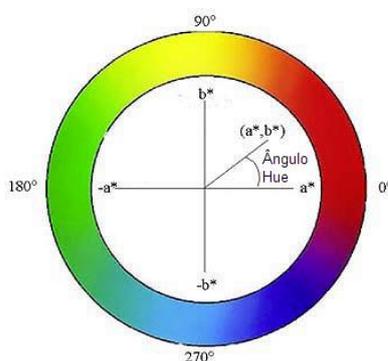
A morfologia das membranas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente secas, fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92 Å) em suas superfícies. Para a obtenção das imagens da seção transversal, as amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido antes de sua metalização.

3.2.2.2 Cor e opacidade

As análises de cor e opacidade das membranas foram realizadas com a utilização do colorímetro Hunterlab (Colorquest II, Fairfax, EUA), utilizando-se os padrões CIELab. Este sistema separa a diferença total de cor (ΔE^*) em três componentes: luminosidade (L^*), que varia de mais claro (ΔL^* positivo) a mais escuro (ΔL^* negativo); croma, representados normalmente por maior (ΔC^* positivo) ou menor (ΔC^* negativo) intensidade, e ângulo Hue, o qual pode ser observado na

Figura 12, e que dá a medida de tonalidade da amostra.

Figura 12 – Sequência CIELab Hue e orientação do ângulo Hue (adaptado de White et al. 2003).



A diferença total de cor (ΔE^*) entre os filmes de diferentes composições polissacarídicas com fármaco e sem fármaco foi calculada através da Equação 1, enquanto o ângulo Hue foi determinado pela Equação 2 e o croma, pela Equação 3:

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_i^* - L_p^*)^2 + (a_i^* - a_p^*)^2 + (b_i^* - b_p^*)^2} \quad \text{Equação 1}$$

onde L_p^* , a_p^* e b_p^* são os parâmetros de cor da membrana sem fármaco e L_i^* , a_i^* e b_i^* referem-se às amostras contendo imiquimode.

$$\text{Hue} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Croma} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad \text{Equação 3}$$

Por fim determinou-se ainda a opacidade das membranas, ou seja, sua obstrução à passagem de luz, pelo método Hunterlab (Hunter Associates Laboratory, 2008) (Hunter Associates Laboratory, 1997). Neste, a opacidade é calculada como a relação entre a opacidade da membrana colocada sobre o padrão preto e a opacidade da membrana colocada sobre o padrão branco.

3.2.2.3 Diâmetro e espessura

Os diâmetros das membranas foram obtidos com o auxílio de uma régua, aferida por escalímetro, de 30 cm (Marte). Já as espessuras foram medidas com micrômetro Digimess ao longo da sua extensão. Os valores médios foram calculados a partir de, no mínimo, 7 medidas em regiões distintas para o diâmetro e 20 para a espessura.

3.2.2.4 Capacidade de absorção de soluções fisiológicas e perda de massa

O comportamento do material obtido foi testado na presença de água deionizada, em solução de saliva simulada composta de 0,8 g/L de NaCl, 1,2 g/L de KCl, 0,19 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, e 0,35 g/L de K_2HPO_4 com pH ajustado para 6,8 (Desai *et al.*, 2011), em solução salina tamponada composta de 2,38 g/L de Na_2HPO_4 , 0,19 g/L de KH_2HPO_4 e 8,0 g/L de NaCl, com pH ajustado para 7,0 (Cubayachi *et al.*, 2015; Sankalia *et al.*, 2007) e ainda em solução tampão acetato a 100 mmol/L e pH 4,0.

Foram cortados corpos de prova devidamente preservados pelo menos 24 horas em dessecador contendo cloreto de lítio (LiCl , 11% de UR), em triplicata, de 6 cm x 1 cm, com massa inicial (m_{inicial}) determinada em balança analítica modelo TE214S (Quimis). As amostras foram então imersas em 10 mL das referidas soluções por 24 horas a 37 °C. Após este período, o excesso de solvente foi levemente removido com papel de filtro e as amostras

foram novamente pesadas em balança analítica para a determinação das massas finais ($m_{úmida}$). Já para o ensaio de perda de massa, as amostras ficaram imersas por 7 dias sob as mesmas condições, depois foram secas até apresentarem massa final constante (m_{final}). A capacidade de absorção de soluções fisiológicas (Ab_i) foi calculada através da Equação 4 em gramas de solução por gramas de membrana seca. Já a perda de massa (P_i), foi obtida através da Equação 5, expressa em fração de massa inicial (%).

$$Ab_i = \frac{m_{úmida} - m_{inicial}}{m_{inicial}} \quad \text{Equação 4}$$

$$P_i = \frac{(m_{inicial} - m_{final})}{m_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

O índice i refere-se às diferentes soluções fisiológicas empregadas.

3.2.2.5 Análise da eficiência de incorporação de Imiquimode

A eficiência de incorporação de imiquimode foi determinada em duplicata empregando-se amostras circulares de membrana de raio 1,6 cm, de massa conhecida, de formulações com e sem fármaco. As amostras foram colocadas em contato com soluções de desintegração das membranas por períodos pré-estabelecidos, à 37°C, sob agitação de 100 rpm.

Para as membranas de quitosana, foram utilizados 50 mL de solução de tampão acetato a 100 mmol/L e pH 4,0 por 5 horas. Para as formulações de alginato, foram empregados 50 mL de tampão citrato (solução aquosa de citrato de sódio 2% m/v) e, após 2 h de contato, foram adicionados mais 50 mL de tampão acetato. Para as formulações QA foram empregados 25 mL da solução salina tamponada descrita no item 3.2.24 e, após o contato das membranas com esta solução por 5 h, adicionou-se também à mistura 25 mL de solução de tampão acetato.

Todas as formulações foram sonicadas (3510DTH, Branson) por uma hora à temperatura ambiente após a exposição aos respectivos solventes, de modo a auxiliar na solubilização do fármaco.

Em seguida, as amostras com formulação QA foram filtradas utilizando-se um funil de Büchner de porcelana e um papel de filtro (14 µm de poro, Qualy) encaixados em um Kitassato acoplado a um sistema de bomba a vácuo (Q-355B2, Quimis).

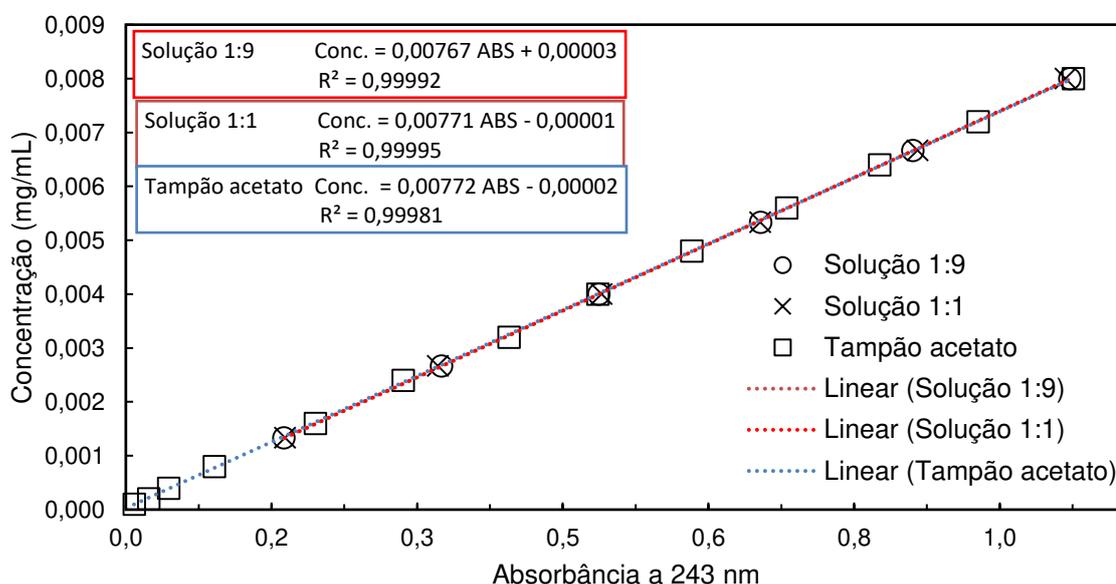
Por fim, as soluções foram analisadas por espectrofotometria de absorção de luz em espectrofotômetro DU640 (Beckman), a um comprimento de onda de 243 nm (pico de máxima absorção de luz do fármaco em solução de tampão acetato. A eficiência de incorporação (ε) foi calculada empregando-se a Equação 6:

$$\varepsilon = \frac{\frac{m_{IQ}}{m_{amostra} - m_{IQ}}}{R_{IQ/polissacarideo}} * 100\% \quad \text{Equação 6}$$

onde m_{IQ} é a massa de fármaco determinada no material final, $m_{amostra}$ é a massa de amostra do filme polimérico, $R_{IQ/polissacarideo}$ é a razão mássica entre a quantidade de fármaco adicionada e a massa de polissacarídeos presentes inicialmente na formulação, sendo esta no trabalho, igual a 0,055 g/g.

As concentrações foram determinadas a partir da comparação das absorbâncias obtidas nos experimentos a curvas de calibração previamente preparadas utilizando as mesmas soluções que as empregadas em cada caso, após a diluição apropriada com o próprio tampão acetato (em casos nos quais a concentração de fármaco era muito elevada, a razão solução salina tamponada/tampão acetato foi elevada até 1:9. Como brancos das análises de absorbância foram utilizadas soluções produzidas com amostras de mesma composição polissacarídica, mas livres dos fármacos, nas mesmas soluções respectivas de dissolução. As curvas de calibração podem ser observadas na Figura 13.

Figura 13 – Curvas de calibração para soluções de tampão acetato e de misturas de solução salina tamponada com tampão acetato e nas proporções volumétricas 1:1 e 1:9.



Alternativamente, para as formulações QA, fez-se a análise da eficiência de incorporação também pela determinação da concentração de imiquimode nas soluções de reticulação e lavagem das membranas. Neste caso, coletou-se todas as soluções referentes às etapas de lavagem que entraram em contato com as membranas. Em três frascos por formulação foram coletadas a solução de CaCl_2 da etapa de reticulação secundária, a água da primeira lavagem e a água da segunda lavagem. Este procedimento foi realizado para duas membranas por formulação, gerando assim, respectivamente 300, 400 e 400 mL de solução. As placas de poliestireno onde as membranas foram produzidas foram lavadas com 20 mL de tampão acetato, e esta solução foi também coletada em um outro frasco. A estas soluções, adicionou-se a solução de tampão acetato em mesmo volume ao já coletado. Finalmente, duas amostras por frasco foram analisadas por espectrofotometria de absorção de luz a um comprimento de onda de 243 nm, como realizado anteriormente, e os valores respectivos de concentração de imiquimode foram determinados a partir de curvas de calibração produzidas com soluções de composições equivalentes. De posse destes valores, calculou-se a massa total de imiquimode liberado durante a produção das membranas para cada formulação e comparou-se com a massa inicial adicionada para a determinação da eficiência de incorporação do fármaco.

3.2.2.6 Cinética de liberação do imiquimode

A determinação da cinética de liberação do fármaco foi realizada utilizando amostras de massa conhecida e tamanho de 2 cm x 2 cm imersas em 15 ou 50 mL de solução de liberação (o primeiro para solução salina e saliva simulada e o segundo para o tampão acetato 100 mmol/L e pH 4,0), com as amostras livres na solução (para a saliva simulada e tampão acetato) ou presas à parede do frasco (para a solução salina tamponada) utilizando adesivo acrílico transparente dupla face de alta adesão (Fita Scotch® Fixa Forte, 3M) de mesmas dimensões, a qual apresentou absorbância desprezível a 243 nm quando imersa em solução salina tamponada. Amostras de 1,0 mL foram periodicamente coletadas ao longo do ensaio e este volume foi repostado por fluido fresco. A concentração de fármaco foi analisada por espectrofotometria de absorção de luz, no comprimento de onda de 243 nm.

A determinação do mecanismo de liberação foi realizada através do ajuste linear do modelo de Kosmeyer-Peppas aos dados experimentais linearizados, utilizando o software Microsoft Excel 2016.

3.2.2.7 Determinação da mucoadesividade da membrana

A mucoadesividade das membranas foi analisada *in vitro* com base no trabalho de Abruzzo *et al.* (2012). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP). Em decorrência de sua similaridade com o tecido oral humano, foi empregada mucosa bucal suína. A mucosa fresca de porcos machos recém-abatidos foi coletada em abatedouros locais e imersa em tampão fosfato a pH 7,4 até o momento de separação cirúrgica da cavidade oral. Em seguida, foram recortados retalhos da mucosa bucal, com áreas superiores a 1 cm², hidratando-se os mesmos por 5 minutos em solução salina antes do ensaio. Cada amostra de membrana com aproximadamente 1 cm de diâmetro foi fixada ao texturômetro TA.XT plus (Stable Micro Systems SMD, Inglaterra) adaptado com fita adesiva dupla face e depois colocada em contato com o retalho de mucosa devidamente fixado entre dois suportes acrílicos apertados com parafusos, como pode ser observado nas Figuras 14 e 15.

Foi então aplicada uma força de 0,50 N por 30 s, no sentido de pressionar levemente a mucosa à superfície da membrana e, na sequência, a amostra de membrana foi deslocada verticalmente na velocidade de 1 mm/s até que se separasse do retalho de mucosa, registrando-se a força e o trabalho requeridos para tal, obtendo-se assim um indicativo do grau de mucoadesividade ao se comparar os resultados, obtidos em pelo menos quintuplicata, para cada formulação.

Figura 14 – Suporte acrílico com retalho de mucosa bucal devidamente fixado (imagem à direita adaptada de Texture Technologies Corp. e Stable Micro Systems, 2017).

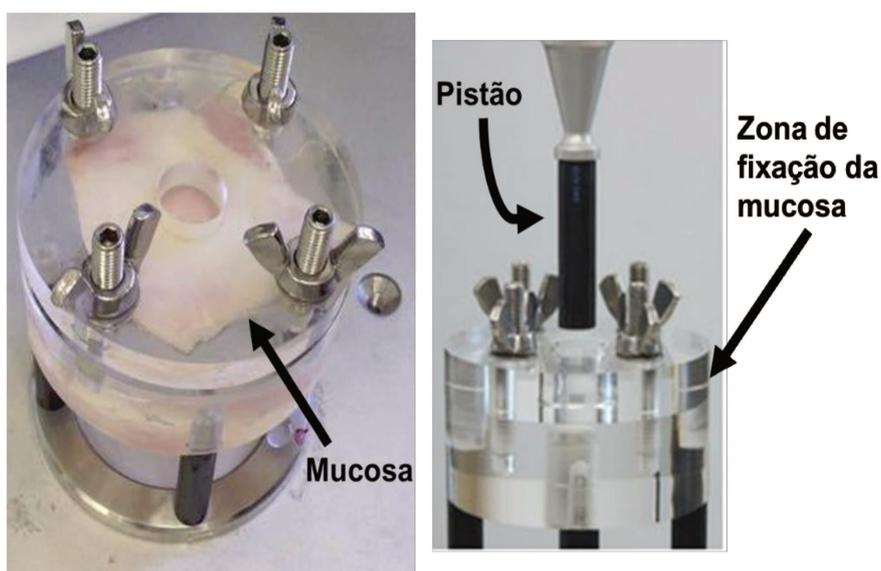
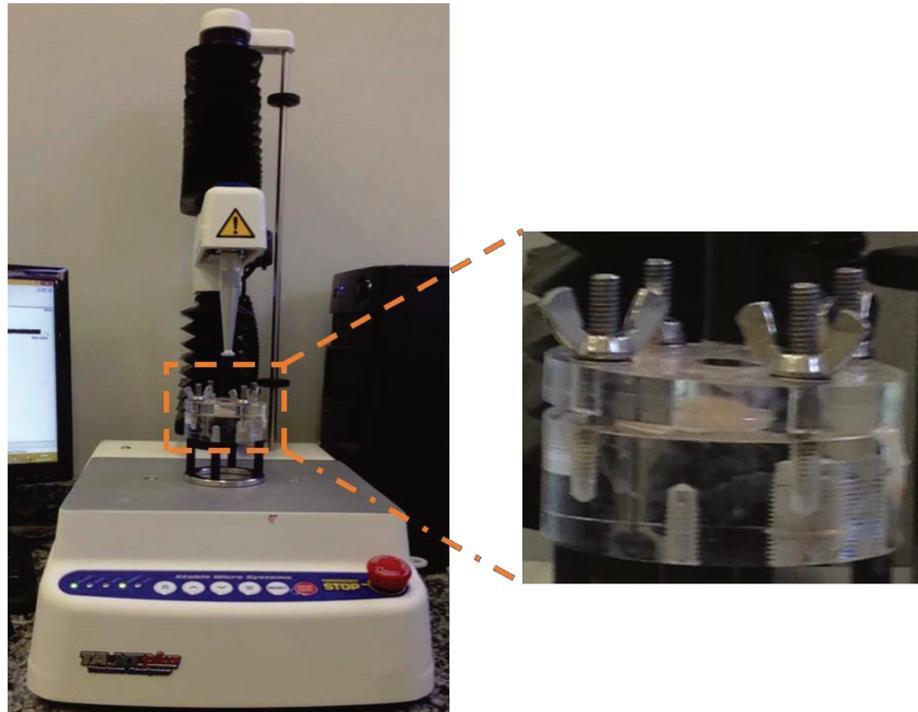


Figura 15 – Equipamento utilizado para o ensaio de mucoadesividade (a imagem à direita é uma ampliação da seção marcada da imagem original).



3.2.2.8 Propriedades Mecânicas

Com base na norma D-882 (ASTM, 2012), foram determinadas as propriedades mecânicas dos corpos de prova referentes à tensão e alongamento na ruptura utilizando-se o texturômetro TA.XT2 (Stable Micro System). Para este ensaio, foram utilizadas no mínimo 8 amostras de membrana de 10 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, com espessura média medida em pelo menos 10 pontos aleatórios de cada corpo de prova.

Estas amostras foram fixadas a duas garras pneumáticas, com distância pré-estabelecida de 5,0 cm entre si, uma das quais, durante o funcionamento do equipamento, afastou-se a uma velocidade de 0,1 cm/s empregando-se uma célula de carga de 5,098 kgf. As amostras utilizadas neste ensaio foram previamente armazenadas em dessecador contendo cloreto de lítio (LiCl, 11% de umidade relativa) por pelo menos 48 horas antes da realização do ensaio.

Com os dados obtidos no ensaio, foi possível determinar a tensão (T_R) e o alongamento (A_L) das membranas na ruptura utilizando-se a Equação 7 e a Equação 8:

$$T_R = \frac{F_m}{A_T} \quad \text{Equação 7}$$

$$A_L = \frac{d}{d_i} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

onde T_R é medida em [MPa], A_L em [%], F_m é a força máxima de rompimento [N], A_T é a área transversal [mm²], d_i é a distância inicial das garras do equipamento [mm] e d a distância das garras no momento da ruptura [mm].

3.2.2.9 *Análise Termogravimétrica (TGA)*

As análises termogravimétricas foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC – FEQ/UNICAMP) empregando-se o equipamento TGA/DSC1 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suíça). Em cadinhos de alumina de 70 µL foram colocadas amostras com massa de aproximadamente 8 mg. O material foi aquecido, a uma taxa de 10°C/min, de 25°C a 600°C, e a variação de massa foi analisada. Os experimentos foram realizados em atmosfera de nitrogênio, com vazão de 100 mL/min.

3.2.2.10 *Espectroscopia no infravermelho (FTIR)*

As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC – FEQ/UNICAMP) de modo a identificar as possíveis interações entre os polímeros e o imiquimode. As análises foram realizadas tanto para as membranas quanto para o fármaco isolado.

As amostras foram cortadas em dimensões de 1 cm x 2 cm e então armazenadas por pelo menos 24 horas em dessecador com cloreto de lítio (LiCl, 11% de umidade relativa). Através do espectrofotômetro FTIR Nicolet 6700 da marca ThermoScientific foi possível obter os espectros, com varredura de absorção de 4000 a 400 cm⁻¹ para o imiquimode e 4000 a 675 cm⁻¹ para as membranas, com resolução de 4 cm⁻¹. Um total de 32 varreduras foi acumulado para o fármaco e 128 para os demais materiais.

3.2.2.11 *Ensaio biológicos in vitro*

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP). Nestes

foram utilizadas duas linhagens tumorais humanas, FaDu e HN13, e uma linhagem murina, a 4T1, disponíveis no laboratório mencionado.

A primeira linhagem, estabelecida a partir de tecido retirado de um tumor do tipo CCE na hipofaringe, é composta de células epiteliais. Já a segunda trata-se de uma linhagem tumoral derivada de células de carcinoma espinocelular de língua. Por fim a terceira é derivada de uma linhagem de câncer de mama murino de estágio IV, proveniente de tecido mamário glandular, e possui morfologia epitelial.

Todas as linhagens foram cultivadas em placas de cultura de poliestireno (100 mm de diâmetro) com superfície tratada para células aderentes utilizando meio de Eagle modificado por Dubelcco (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) e agentes antibacterianos e antimicóticos (Sigma Aldrich) e mantidas em incubadora umidificada (HERA CELL 240i, Thermo Scientific) a 37°C na presença de 5% de CO₂.

3.2.2.11.1 Análise da citotoxicidade

A análise da citotoxicidade foi baseada no uso da resazurina, um composto que é reduzido pela população de células viáveis para sua forma fluorescente cor de rosa, a resofurina. Devido à direta correlação entre a redução deste composto e a concentração da população celular, é possível utilizar esta técnica como teste indireto de viabilidade e/ou de proliferação celular (O'Brien *et al.*, 2000).

Foram realizados ensaios de citotoxicidade direta tanto com membranas contendo o fármaco quanto com membranas livres do composto, e para fins de comparação, analisou-se também o desempenho do fármaco livre em solução. Em todos os casos, as células utilizadas foram adequadamente distribuídas em placa de 24 poços com 1 mL de meio de cultura aproximadamente 24 horas antes do teste de citotoxicidade. As células foram tratadas ou não com 2,5 a 20 µg/mL do fármaco solubilizado em meio de cultura contendo DMSO (concentração máxima do DMSO de 0,5%) e mantidas em incubadora por 24, 48 ou 72 horas. As células foram também incubadas em meio de cultura contendo 2% de DMSO por poço, que serviu como controle da perda de viabilidade. Um controle para o imiquimode sem células foi realizado para confirmar a não interferência do composto na análise da atividade do indicador metabólico (resazurina).

Após este período, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se novo meio com 0,01 mg/mL de resazurina e as células foram novamente colocadas na incubadora por 3 horas,

protegidas da luz. A fluorescência foi então medida utilizando-se fluorímetro de placas Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Winooski, VT, EUA), com comprimentos de onda de excitação de 530/25 nm e de emissão de 590/35 nm. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata experimental (três poços da mesma placa inoculadas com a mesma suspensão celular) e duplicata biológica (duas placas de cultivo, cada uma com inóculo preparado de forma independente).

Para os ensaios contendo as membranas, as amostras, na forma de círculos de 1 a 1,6 mm de diâmetro e esterilizadas por exposição a óxido de etileno na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda (Campinas, SP, foram adicionadas ao invés da solução de DMSO com imiquimode, com a retirada da membrana após o período de incubação correspondente. Posteriormente se prosseguiu seguindo os mesmos procedimentos anteriores.

Já na análise da citotoxicidade indireta, em que se verifica o efeito da presença de compostos extraídos das membranas na proliferação das células, mas não o seu contato direto com as mesmas. Neste caso, amostras circulares de 1,6 mm de membranas foram colocadas previamente em contato com 1 mL de meio de cultura por 24 horas em placas de 24 poços, mantidas em incubadora umidificada a 37°C na presença de 5% de CO₂. Após este período, o meio de cultura foi transferido para outra placa de cultivo onde as células já haviam sido adicionadas com 24 h de antecedência, seguindo-se assim o procedimento como descrito anteriormente.

3.2.2.11.2 *Análise de proteínas por Western blott*

A análise de proteínas por *Western blott* foi utilizada visando à identificação de algumas proteínas extraídas da matriz celular, como a Nf-κB (fator nuclear kappa B). Para obtenção destes extratos proteicos, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS), composto por NaCl 137 mmol/L, KCl 2,7 mmol/L, Na₂HPO₄ 9,1 mmol/L, KH₂PO₄ 1,8 mmol/L e pH ajustado para 7,4. Foram então lisadas com tampão CelLytic™ M (Sigma-Aldrich) adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich). As amostras foram submetidas a ultrassonicação no aparelho Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, Modelo 100, EUA), em três ciclos de 10 segundos, com potência de 50%. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000 x g por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubo de 1,5 mL em freezer à -80°C até o momento do uso.

A quantificação de proteínas das amostras foi realizada pelo método de Bradford

usando o reagente Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) segundo protocolo informado pelo fabricante.

Cerca de 10 µg de proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970) utilizando sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories), de acordo com as instruções do fabricante. As condições de corrida foram: tampão de corrida Tris-glicina (Tris 25 mmol/L, glicina 250 mmol/L, SDS 0,1%, pH 8,3), amperagem constante (12 mA por gel) e voltagem limite de 110 V durante 90 minutos. Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de fluoreto de polivinilidina (PVDF, GE Healthcare, EUA), utilizando tampão de bicarbonato de sódio (10 mmol/L) e amperagem constante (350 mA) por 90 minutos.

O bloqueio de sítios inespecíficos da membrana foi feito com tampão de bloqueio contendo leite desnatado 5% em solução salina tamponada de Tris (TBS-T), composta por Tris.Cl 25 mmol/L pH 7,5, NaCl 150 mmol/L e Tween-20 0,1%, por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação suave. As lavagens das membranas, três vezes de cinco minutos cada, foram realizadas com TBS-T sob agitação suave à temperatura ambiente. Foram utilizados os anticorpos primários anti-NFκB p65 (sc-372, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) diluído a 1:2.000 e anti-β actina (sc-47778, Santa Cruz) diluído a 1:2.500 em tampão TBS-T de acordo com as recomendações do fabricante e a incubação realizada overnight a 4°C sob agitação suave. Em seguida as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anti-coelho ou anti-camundongo, respectivamente; KPL, Gaithersburg, MD, USA) diluídos em tampão de bloqueio por uma hora à temperatura ambiente.

A quimioluminescência foi detectada utilizando solução de luminol (Tris 0,1 mol/L, pH 8,5, ácido p-coumárico 400 µmol/L, luminol 2,5 mmol/L) acrescido de 0,009% de peróxido de hidrogênio e a membrana foi exposta em filme radiográfico. As bandas obtidas no filme radiográfico foram analisadas por densitometria no *software* ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Para determinar a eficiência de eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana, os géis de poliacrilamida foram incubados com Coomassie blue e as membranas, com Ponceau S.

3.2.2.12 Análise estatística

Utilizou-se o software Statistica 7® para realizar a análise estatística dos dados por

meio do teste de Tukey, determinando-se as diferenças significativas das médias, a um nível de confiança de 95%, e, portanto, a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

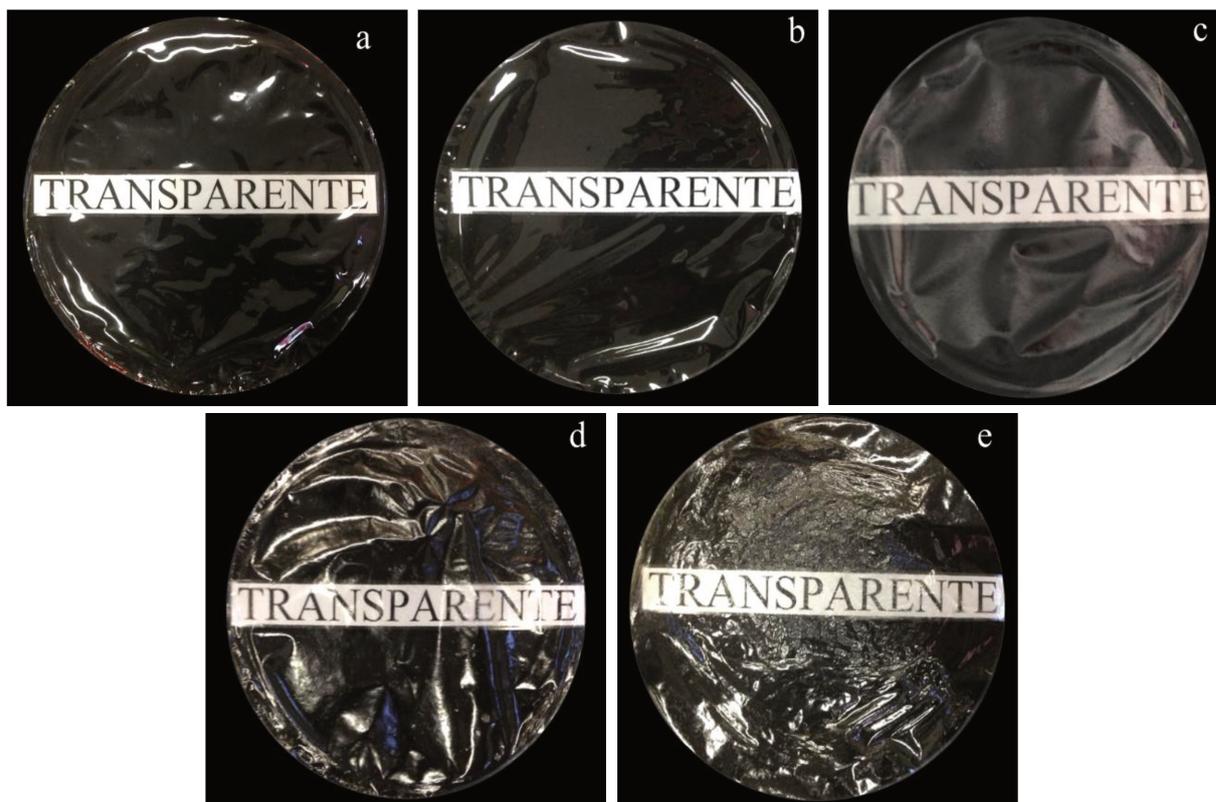
4.1 Aspecto Análise da Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Figura 16, pode-se observar o aspecto visual típico das membranas produzidas neste trabalho na ausência do imiquimode, quando avaliadas a olho nu.

É possível notar que as membranas dos polímeros quitosana e alginato isolados são transparentes, brilhantes e lisas, enquanto as produzidas com combinações destes polissacarídeos apresentam-se um pouco mais opacas.

A adição de Imiquimode afeta claramente a estrutura física da membrana, deixando-a mais opaca e esbranquiçada, como se pode verificar na Figura 17.

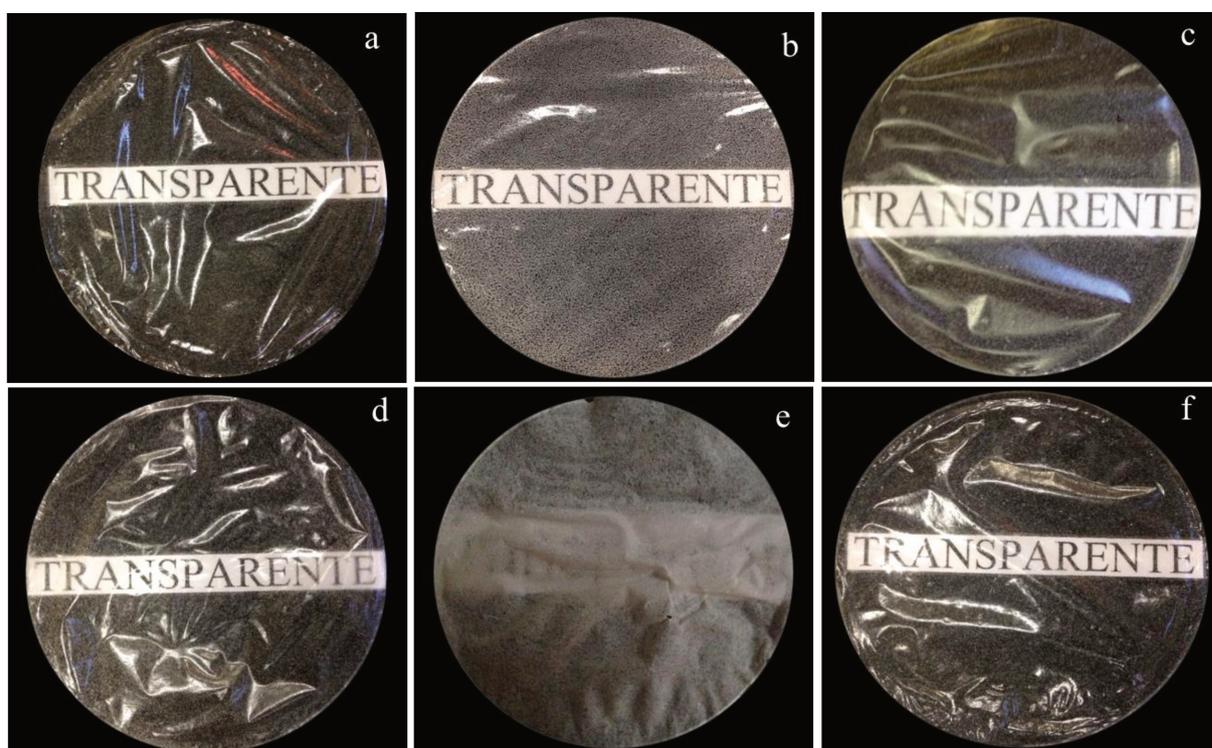
Figura 16 – Aspecto visual típico das membranas de alginato (a), quitosana (b), quitosana e alginato (1:1 A e B) (c, d) e quitosana e alginato (1:3) (e) preparadas na ausência de imiquimode.



Estes efeitos são provavelmente atribuíveis à baixa solubilidade do imiquimode, que precipita na matriz polissacarídica após a evaporação do ácido acético. Apesar de não mostrado claramente na Figura 17, notou-se apreciável encolhimento nas membranas às quais

se adicionou fármaco, o que pode ser resultante da interação iônica das aminas primárias do imiquimode com grupos carboxílicos livres do alginato, ou ainda da ocorrência de ligações de hidrogênio do fármaco com os polímeros da membrana, resultando em uma maior aproximação das camadas e em alteração no seu arranjo espacial.

Figura 17 – Aspecto visual típico das membranas de alginato (a), quitosana (b), quitosana e alginato (1:1 A e B) (c, d, e) e quitosana e alginato (1:3) (f) com 0,055 g de imiquimode por grama de polímero (a, b, c, d, f) e 0,55 g IQ por grama (e) de polímero.



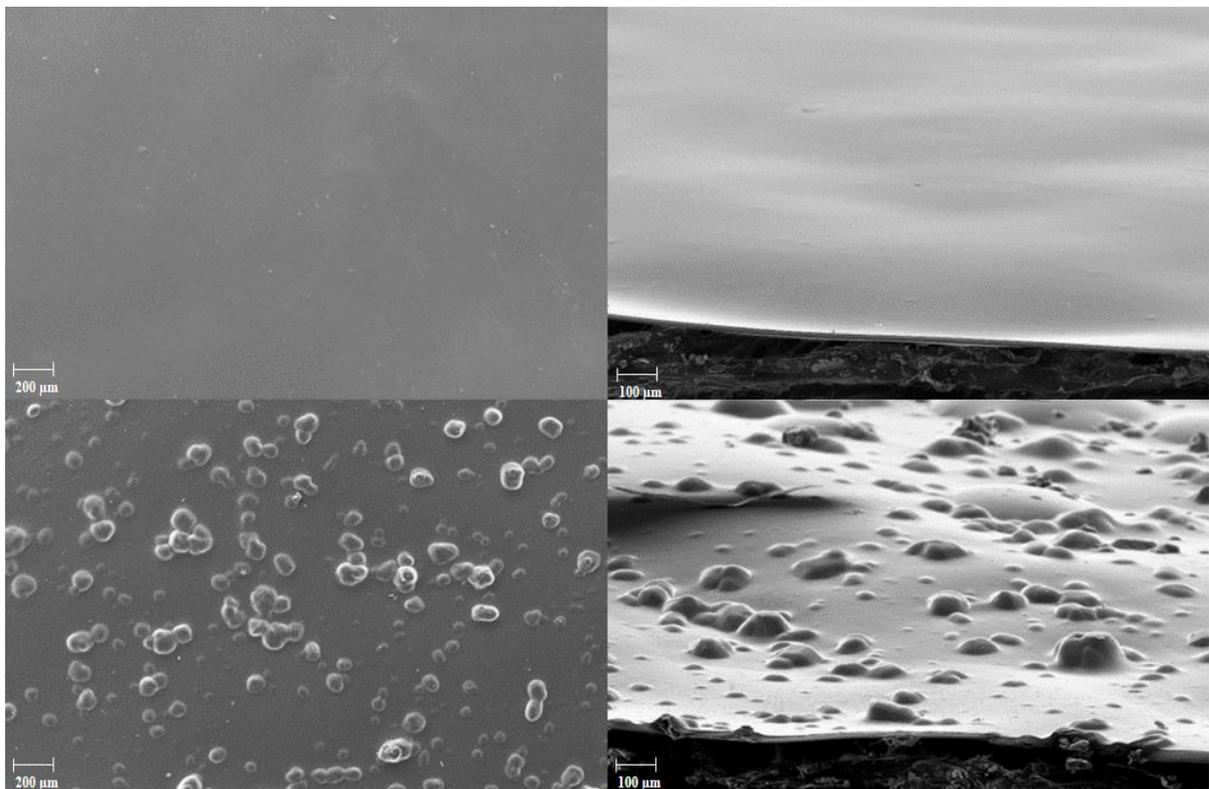
A membrana de quitosana preparada na presença do fármaco apresentou pequenas fibras brancas dispersas por toda sua estrutura, provavelmente devido à deposição do fármaco ou ainda à interação deste com o polímero. Já na membrana produzida apenas com alginato o fármaco mostrou-se como pequenos agregados aproximadamente esféricos distribuídos pela estrutura.

Nas membranas de quitosana e alginato combinados pode-se observar também material precipitado distribuído pela estrutura, não se notando diferença significativa entre as duas diferentes proporções de polímeros (1:1 e 1:3) preparadas com 0,055 g de IQ por grama de polímero (Figura 17 d, f). Já a membrana produzida com maior quantidade de fármaco (QA 1:1 A, com razão mássica fármaco polímero de 0,55 g/g) apresentou estas propriedades

mais acentuadas, mostrando-se mais opaca e com mais material agregado esbranquiçado disperso por sua estrutura, praticamente impossibilitando a visualização da palavra "transparente" embaixo da membrana (Figura 17 e).

Análises por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para as membranas de quitosana e alginato isolados e também para o complexo polieletrólito nas proporções 1:1 e 1:3, avaliando-se todas as combinações, com e sem a adição do fármaco. Os resultados podem ser observados nas Figuras 18 a 21.

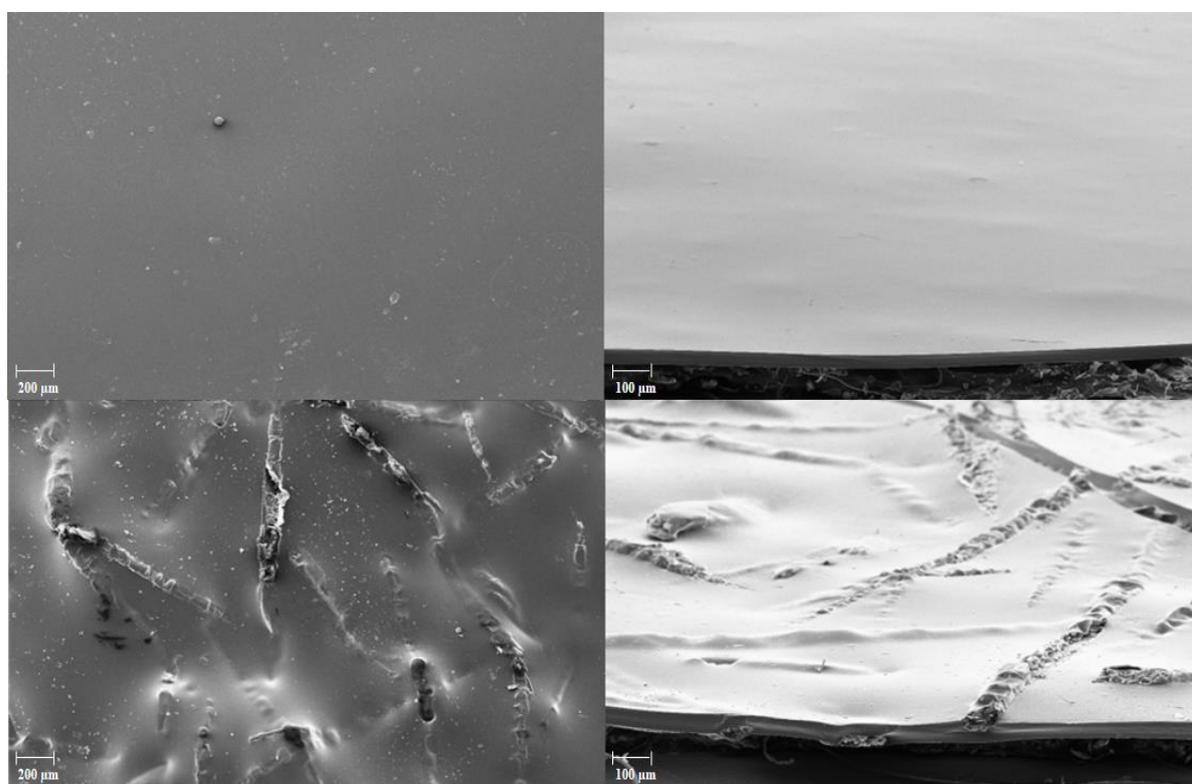
Figura 18 - Visão da superfície (imagens à esquerda) e corte transversal (imagens à direita) de membranas de alginato sem fármaco (superiores) e com adição de imiquimode (inferiores), na razão mássica de 0,055 g de IQ por grama de polímero.



Diferentemente do encontrado para as formulações de QA 1:1 e 1:3 por Bierhalz e Moraes, (2016), as membranas sem fármaco são todas bastante semelhantes; apresentaram-se lisas, finas e sem rugosidades ou imperfeições representativas. Já as microscopias realizadas pelas autoras mostram uma maior heterogeneidade e certa rugosidade na superfície das membranas de QA 1:1. Mais destoante é o aspecto do material produzido por Girata (2011), visto que as membranas de QA apresentaram-se com fibras e multilamelares; entretanto, a magnificação utilizada pela autora foi muito maior que a empregada no presente trabalho.

Esta diferença pode ser também decorrente de alterações nas concentrações de soluções de cálcio adicionadas. No presente trabalho, a redução da presença dos cátions bivalentes pode ter feito com que a formação do PEC acontecesse mais vagarosamente, visto que a quantidade de cálcio disponível no meio era menor durante a adição, permitindo a formação homogênea da estrutura, sem que houvesse colapsos ou separação de fases com diferentes constituições.

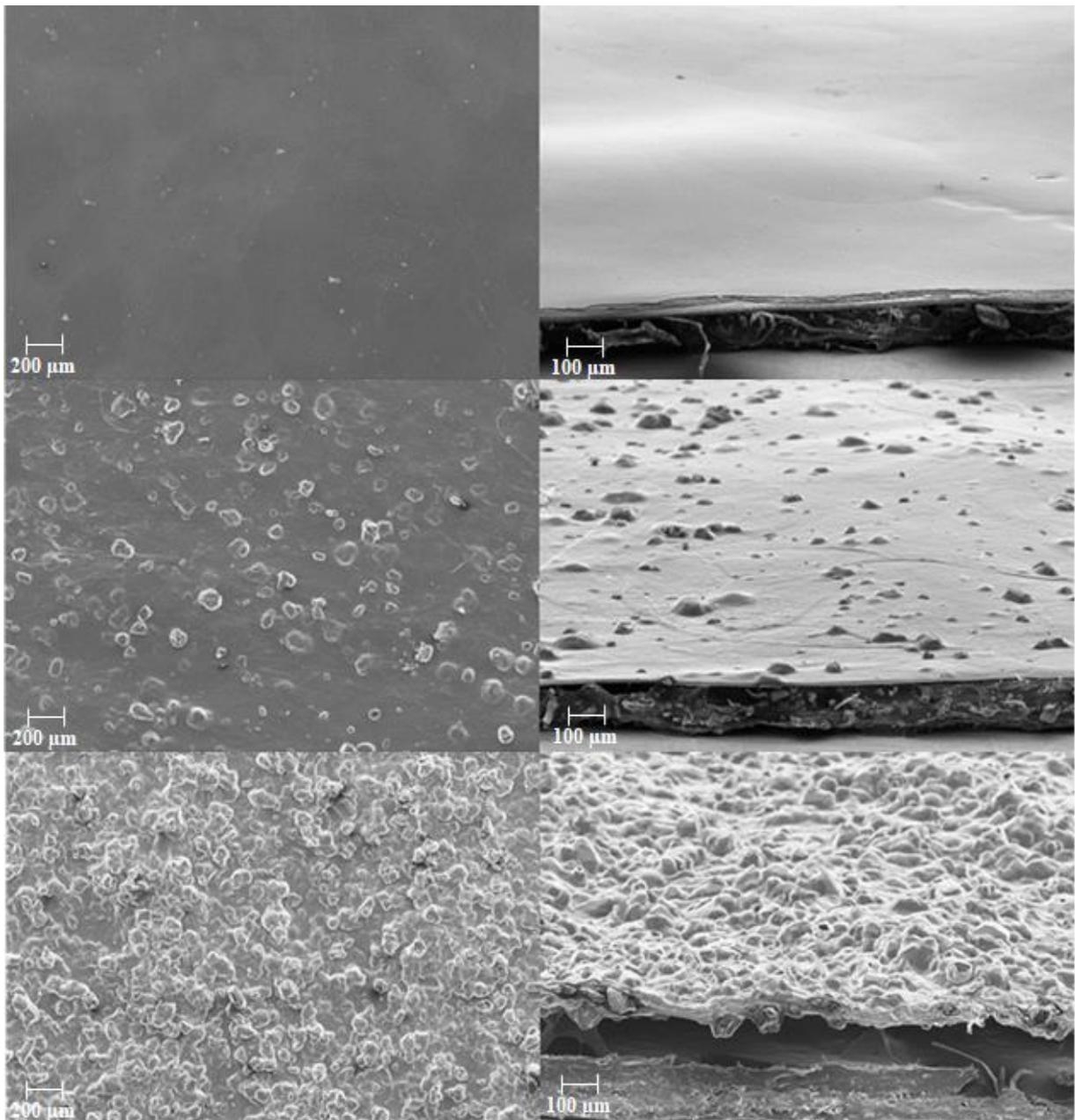
Figura 19 - Visão da superfície (imagens à esquerda) e corte transversal (imagens à direita) de membranas de quitosana sem fármaco (superiores) e com adição de imiquimode (inferiores), na razão mássica de 0,055 g de IQ por g de polímero.



Já quando se adicionou o fármaco, pode-se observar algumas pequenas diferenças entre as membranas. A membrana de quitosana é a que mais difere das demais com o fármaco (Figura 19), visto que o imiquimode mostra-se incorporado na membrana na forma de fibras compridas e estiradas na estrutura, enquanto nas demais há formação de pequenos bolsões de material aglomerado na estrutura da membrana, onde os cristais do fármaco se alojam. No entanto, segundo Zhao *et al.* (2007), o imiquimode forma um único tipo de sistema cristalino ortorrômbico, com simetria não centralizada, de modo que os grupos imidazol, benzeno, piridina e o grupo amina ligado a estes, são coplanares em toda a molécula. Assim, essa diferenciação se deve, provavelmente, à deposição do fármaco por precipitação em

decorrência de sua baixa solubilidade ou às suas interações com o polímero, visto que o imiquimode possui uma amina primária que pode fazer ligações de hidrogênio com o alginato.

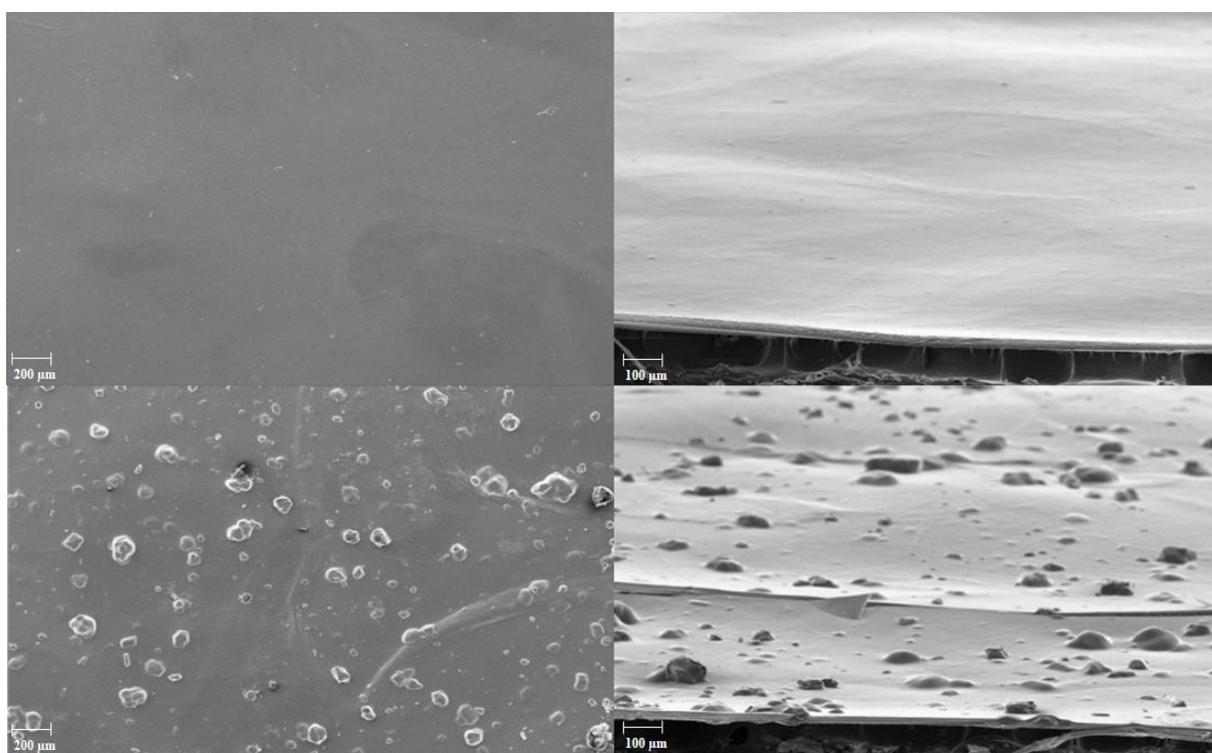
Figura 20 - Visão da superfície (imagens à esquerda) e corte transversal (imagens à direita) de membranas de QA 1:1 B sem fármaco (superiores) e com adição de imiquimode (intermediárias) na proporção de 0,055g por grama de polímero, e membranas de QA 1:1 A com 0,55 g/g (inferiores).



No corte transversal foi possível observar pequenos cristais do fármaco, ainda que

levemente fraturados, em todas as membranas preparadas em sua presença. Entre as membranas de QA 1:1 e 1:3, a semelhança é bastante grande, diferindo apenas pela concentração de bolsões do fármaco, que na proporção 1:3 é um pouco maior, e para a membrana de QA 1:1 A com 10 vezes mais fármaco, que apresenta toda sua topografia tomada por cristais de fármaco.

Figura 21 - Visão da superfície (imagens à esquerda) e corte transversal (imagens à direita) de membranas de QA 1:3 sem fármaco (superiores) e com adição de Imiquimode na razão mássica de 0,055 g de IQ por g de polímero (inferiores).



Como a formulação de QA 3:1 não foi capaz de formar filmes após várias tentativas de produção, não foi dada continuidade aos estudos desta proporção polimérica. Também é importante citar que o estudo das membranas de QA 1:1 A foi interrompido neste trabalho, mantendo-se somente a formulação de QA 1:1 B, pois a redução da concentração dos polímeros adicionados, da quantidade e da concentração da solução de cálcio para reticulação e a redução da quantidade de ácido acético na produção da solução de quitosana foram medidas de otimização que facilitaram a produção de membranas homogêneas e reprodutíveis entre as bateladas. Além disso, como visto neste trabalho, esta formulação otimizada produziu uma membrana bastante semelhante à original.

A formulação QA 1:1 A com maior quantidade de fármaco também foi descontinuada,

pois esta teve sua estrutura demasiadamente alterada, tanto no aspecto visual, quanto em suas propriedades. Esta se tornou mais opaca, esbranquiçada, dura e quebradiça. Assim, deste ponto em diante do trabalho, a formulação QA 1:1 B, selecionada para a continuação do trabalho, será descrita como QA 1:1 somente.

4.2 Diâmetro e Espessura

Quanto ao diâmetro e à espessura, na Tabela 4 encontram-se sumarizados os resultados das medições efetuadas para todas as formulações. Através destes, é possível observar que as formulações que possuem o imiquimode em sua composição apresentaram apreciável diminuição no seu diâmetro, com exceção da membrana de alginato com fármaco, e um aumento expressivo em sua espessura, chegando a 450% no caso das membranas de alginato. Esta variação, tanto no diâmetro quanto na espessura, é dependente da quantidade de fármaco adicionado e de suas prováveis interações com os polímeros, como mencionado anteriormente.

Tabela 4 - Diâmetro e espessura das membranas.

Formulação	Diâmetro (cm)	Espessura (μm)
Alginato	$13,23 \pm 0,25^a$	$29,0 \pm 6,3^a$
Alginato + IQ	$13,44 \pm 0,35^{a,b}$	$131,6 \pm 76,5^b$
Quitossana	$11,85 \pm 0,47^c$	$29,1 \pm 2,4^a$
Quitossana + IQ	$9,68 \pm 1,34^d$	$105,1 \pm 31,6^b$
QA 1:1	$14,54 \pm 0,31^e$	$73,9 \pm 13,8^{b,c}$
QA 1:1 + IQ	$13,07 \pm 0,34^a$	$101,3 \pm 10,3^b$
QA 1:3	$14,01 \pm 0,20^f$	$63,6 \pm 19,1^{a,c}$
QA 1:3 + IQ	$13,78 \pm 0,23^{b,f}$	$96,0 \pm 10,5^{b,c}$

Média \pm desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

Os resultados de espessura encontrados se assemelham aos de Bierhalz e Moraes, (2016) para membranas livres dos fármacos. Segundo Ma *et al.* (2003) substitutos poliméricos para a derme, como curativos, devem ser mais finos que a pele humana, cuja espessura varia de 0,5 a 2,0 mm, dependendo da idade, sexo e região do corpo. Como todas as matrizes

produzidas neste trabalho possuem espessuras inferiores a 0,15 mm, pode-se considerar que estas são apropriadas para o uso com a finalidade estabelecida. Não foram encontrados dados na literatura referentes a limitações de espessura de curativos para uso oral.

4.3 Cor e Opacidade

Pela avaliação quanto ao aspecto, já discutido, e aos parâmetros de cor e opacidade das membranas, sumarizados na Tabela 5, é possível que notar que a formação do PEC aumenta a opacidade das membranas. Isto se dá provavelmente devido ao rearranjo estrutural que este sofre durante a sua formação, que acaba dificultando a passagem de luz.

Quanto à opacidade, é possível observar que a adição do imiquimode resultou em um aumento de até 5 vezes o valor encontrado para a formulação sem fármaco (Tabela 5). Isto se deve à adição do fármaco durante a preparação, o qual é um pó branco, fino e de baixa solubilidade em soluções aquosas, resultando em um aumento da opacidade, como esperado. Ainda assim, todas as formulações possuem valores pequenos de opacidade, inferiores a 6%.

Tabela 5 – Parâmetros de cor e opacidade das membranas.

Formulação	HUE (graus)	Croma	Opacidade (%)	ΔE^*
Alginato	94,41 \pm 0,52 ^a	1,54 \pm 0,17 ^a	0,95 \pm 0,58 ^a	---
Alginato + IQ	91,27 \pm 0,30 ^b	1,89 \pm 0,10 ^{a,b}	4,27 \pm 0,39 ^{b,c}	1,38 \pm 0,09 ^a
Quitosana	98,36 \pm 0,71 ^c	0,78 \pm 0,06 ^c	1,02 \pm 0,42 ^a	---
Quitosana + IQ	88,89 \pm 0,55 ^d	1,72 \pm 0,31 ^d	5,02 \pm 0,57 ^b	4,68 \pm 0,51 ^b
QA 1:1	98,53 \pm 0,37 ^c	1,67 \pm 0,18 ^a	2,04 \pm 1,53 ^{a,c,d}	---
QA 1:1 + IQ	94,37 \pm 0,19 ^a	2,23 \pm 0,11 ^{b,d}	5,10 \pm 0,47 ^b	1,45 \pm 0,15 ^a
QA 1:3	96,43 \pm 0,61 ^e	1,77 \pm 0,24 ^a	4,24 \pm 3,01 ^{b,d}	---
QA 1:3 + IQ	93,71 \pm 0,25 ^a	2,87 \pm 0,24 ^c	5,14 \pm 0,84 ^b	2,44 \pm 0,06 ^c

Média \pm desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

Uma das características desejáveis para curativos é que estes sejam translúcidos, visto que o monitoramento do aspecto visual das lesões é bastante importante no tratamento de tumores de pele. Neste sentido, os resultados aqui descritos mostraram-se bastante satisfatórios. Os valores encontrados foram todos inferiores aos apresentados por Bierhalz e

Moraes (2016), provavelmente pela utilização de uma solução de cálcio de menor concentração, fazendo com que a formação do PEC seja mais vagarosa, sem acúmulos de material, que porventura impediriam mais a passagem da luz.

A adição do fármaco resultou ainda em uma redução do ângulo HUE e no aumento do croma todas as formulações. Pode-se observar ainda uma variação da diferença total de cor (ΔE^*) mais significativa para as composições que possuem o alginato em maior proporção.

A diferença total de cor (ΔE), parâmetro responsável pela comparação de forma geral dos parâmetros ópticos do filme com imiquimode e os filmes sem fármaco, mostra que os filmes alginato e os de QA 1:1 apresentaram uma coloração mais próxima à dos respectivos filmes originais, e o filme de quitosana foi o que mais diferiu. O motivo deste comportamento provavelmente tem origem da formação da membrana, quando o fármaco é adicionado na solução de quitosana em ácido acético, um meio ácido no qual apresenta maior solubilidade. No entanto, no processo de evaporação dos solventes para a formação da membrana, com a saída do ácido acético, o fármaco precipita, alterando a estrutura da membrana, agrupando-se em fibras (única formulação na qual isto acontece), o que altera a passagem de luz pelo material, e, portanto, todas as propriedades relacionadas à luz, em maiores proporções do que as demais formulações.

4.4 Capacidade de Absorção e Perda de Massa

O comportamento dos filmes foi também avaliado em água deionizada e na presença de diversas soluções aquosas, como solução salina, saliva simulada e tampão acetato, estas descritas na metodologia experimental.

É possível observar, através da análise da Tabela 6, que os filmes são capazes de absorver pelo menos sua própria massa em água deionizada, ou até 57 vezes seu valor original, como foi o caso do filme de QA 1:1 + IQ quando imerso em tampão acetato.

Os filmes poliméricos absorvem bastante água ou solução aquosa devido à hidratação dos grupos hidrofílicos presentes na estrutura da quitosana e, particularmente, do alginato, sendo que este último possui maior capacidade de intumescimento. A solução preenche os espaços vazios entre os polímeros, penetrando na estrutura e resultando na relaxação da matriz devido à pressão osmótica (Pasparakis e Bouropoulos, 2006). Ligações de hidrogênio provavelmente ocorrem em grande proporção entre os grupos receptores da matriz polimérica e a água, de forma que as altas capacidades de absorção não devem resultar somente da entrada de solução na matriz por canais presentes na estrutura do material.

As absorções das membranas em água mostraram-se bastante semelhantes ao encontrado por Bierhalz e Moraes (2016), com valores de 1 a 3 g de fluido por grama de polímero.

Já a saliva simulada, por ser uma solução aquosa com baixa concentração de sais, apresentou efeitos intermediários entre os apresentados pela água e a solução salina. A presença de íons em solução, capazes de interagir com as cadeias de alginato, pode resultar na desestruturação da matriz, alterando assim a sua forma e possivelmente aumentando-a, fazendo com que a capacidade de absorção desses filmes seja superior.

Segundo Mallepally *et al.* (2013), polímeros iônicos como o alginato, quando em soluções salinas apresentam comportamento tipicamente atribuído aos fenômenos de *salting-in*, em que a presença dos íons intensificam as interações dos polímeros com a água, resultando em um aumento na absorção e, conseqüentemente, levam à perda de massa devido à desestruturação das interações da matriz. Essas interações são diretamente proporcionais à força iônica do meio de absorção, portanto soluções mais ionicamente concentradas aumentam a capacidade da matriz de absorvê-las.

Não foi possível determinar a capacidade de absorção nem a perda de massa em solução salina tamponada das formulações compostas somente de alginato e mesmo daquelas combinando quitosana e alginato, visto que estas se desintegraram no período de 24 horas em contato com este meio. Isto provavelmente se relaciona à alta concentração de sais presentes na solução, os quais tornaram a força iônica do meio aquoso suficientemente alta para que a capacidade de absorção da membrana fosse alta o bastante, comprometendo a integridade da matriz.

O tampão acetato foi capaz de solubilizar a membrana de quitosana devido a seu pH de 4,0 e a esta ser solúvel em soluções ácidas, particularmente das compostas por ácido acético, um dos seus solventes mais utilizados. Já o alginato novamente sofreu interações com os íons presentes em solução, mas não o suficiente para desestruturar completamente a matriz. Quando a quitosana está combinada com o alginato, este impede que a membrana seja totalmente solubilizada, mas ocorre expressiva absorção de fluido. Para os casos intermediários, as proporções 1:1 e 1:3, os efeitos do solvente na capacidade de absorção ainda estão presentes, relacionando-se à quantidade de quitosana presente na formulação.

Assim, a formulação QA 1:1, que consiste de 50% de quitosana, é capaz de absorver quantidades bastante altas de tampão acetato, pois ainda existem grandes números de cadeias de quitosana interagindo com o ácido acético. Já para a formulação 1:3, da qual a quitosana compõe somente 25% da formulação, o número de cadeias capazes de interagir com o ácido

acético diminui, o que resulta na redução da capacidade de absorção.

Na maioria dos casos, a adição do fármaco resultou na redução da absorção de água e de saliva simulada, supõe-se que devido à sua alta hidrofobicidade.

Tabela 6 – Capacidade de absorção de soluções aquosas pelas membranas após 24 horas a 37°C.

Formulações	Capacidade de absorção (g/g)			
	Água	Saliva Simulada	Tampão Acetato	Solução Salina
Alginato	1,11 ± 0,08 ^{a,A}	10,42 ± 0,47 ^{a,B}	6,25 ± 0,06 ^{a,C}	M.S.
Alginato + IQ	1,38 ± 0,13 ^{a,b,A}	8,67 ± 0,25 ^{b,B}	5,80 ± 0,42 ^{a,C}	M.S.
Quitosana	1,68 ± 0,25 ^{b,c,A}	1,79 ± 0,20 ^{c,A}	M.S.	1,60 ± 0,08 ^{a,A}
Quitosana + IQ	1,58 ± 0,06 ^{a,c,A}	1,60 ± 0,08 ^{c,A}	M.S.	1,82 ± 0,06 ^{a,B}
QA 1:1	2,31 ± 0,20 ^{d,A}	3,65 ± 0,28 ^{d,A}	26,23 ± 3,16 ^{b,B}	M.S.
QA 1:1 + IQ	1,67 ± 0,10 ^{b,c,A}	3,22 ± 0,11 ^{d,B}	57,19 ± 0,92 ^{c,C}	M.S.
QA 1:3	1,82 ± 0,20 ^{b,c,d,A}	6,26 ± 0,35 ^{e,B}	17,30 ± 3,10 ^{d,C}	M.S.
QA 1:3 + IQ	1,44 ± 0,11 ^{a,A}	5,23 ± 0,36 ^{f,B}	17,54 ± 1,17 ^{d,C}	M.S.

MS: Membrana solubilizada. Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

Os resultados do ensaio de perda de massa em água, no geral, corroboram com os dados de absorção, visto que a membrana que absorve muito fluido tende a se desestruturar e sofrer erosão durante esse período ou ainda durante o período de secagem. Não foram verificadas grandes diferenças estatísticas em relação às membranas produzidas sem o fármaco, como pode ser visto na Tabela 7.

Os filmes imersos na saliva simulada seguiram o mesmo padrão da absorção: os filmes que contêm o fármaco originalmente absorveram menos fluido, sofrendo assim menor perda de massa. Esse efeito se deve provavelmente à progressiva dissolução dos polissacarídeos, gerando assim uma maior perda de massa no caso de formulações que absorveram maior quantidade de solução originalmente.

Já em tampão acetato houve uma pronunciada perda de massa das membranas, novamente devido ao elevado volume de solução absorvido, que provavelmente solubilizou parte da estrutura.

Comparando estes resultados com os obtidos por Bierhalz e Moraes, (2016), estes diferem no fato que as perdas de massa em água foram de 4 a 5 vezes menores que as verificadas pelas autoras. Novamente, supõe-se que o motivo desta observação está na melhor estruturação do PEC quando a formulação é produzida na presença de soluções de Ca^{++} de menor concentração.

Tabela 7 – Perda de massa das membranas quando expostas a soluções aquosas por 7 dias a 37°C.

Formulações	Perda de Massa (%)			
	Água	Saliva Simulada	Tampão Acetato	Solução Salina
Alginato	2,07 ± 1,16 ^{a,A}	9,79 ± 1,10 ^{a,B}	19,90 ± 0,34 ^{a,C}	M.S.
Alginato + IQ	1,06 ± 0,11 ^{a,A}	8,86 ± 2,29 ^{a,B}	22,14 ± 0,65 ^{a,b,C}	M.S.
Quitosana	1,51 ± 0,21 ^{a,A}	2,09 ± 0,93 ^{b,A}	M.S.	4,22 ± 1,66 ^{a,A}
Quitosana + IQ	2,09 ± 1,29 ^{a,A}	0,66 ± 1,67 ^{b,A}	M.S.	3,52 ± 0,08 ^{a,A}
QA 1:1	2,03 ± 0,80 ^{a,A}	3,65 ± 0,61 ^{b,A}	27,20 ± 2,75 ^{b,B}	M.S.
QA 1:1 + IQ	2,24 ± 0,58 ^{a,A}	2,09 ± 0,20 ^{b,A}	39,35 ± 1,33 ^{c,B}	M.S.
QA 1:3	2,77 ± 1,42 ^{a,A}	9,62 ± 0,71 ^{a,B}	19,84 ± 3,29 ^{a,b,C}	M.S.
QA 1:3 + IQ	1,99 ± 0,61 ^{a,A}	8,00 ± 0,70 ^{a,B}	20,92 ± 1,55 ^{a,b,C}	M.S.

MS: Membrana solubilizada. Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

4.5 Eficiência de incorporação de Imiquimode

As membranas preparadas com o fármaco apresentaram de forma geral, eficiências de incorporação adequadas, sendo a membrana de alginato a menos eficaz na retenção do composto, e a de quitosana, a mais eficaz, conforme se pode observar na Tabela 8.

Um provável motivo para esta observação é o fato de que a solução de partida de quitosana, sendo preparada em solução aquosa de ácido acético a 1%, apresenta pH ácido. O fármaco possui maior solubilidade em baixos valores de pH, o que foi comprovado na prática ao se notar que a solução se torna incolor após a adição do imiquimode, e que, durante a secagem, a presença do fármaco torna-se evidente em decorrência de sua precipitação durante a evaporação da solução. Muito provavelmente este ainda seja o motivo pelo qual essa

membrana é a única que apresenta pequenas fibras de fármaco disperso em sua matriz em vez de bolsões de sólido.

Como esperado, a eficiência de incorporação da membrana de quitosana foi bastante alta, visto que a adição do fármaco é feita diretamente à solução de quitosana em ácido acético 1%, portanto em uma região de pH mais apropriada para a solubilização do imiquimode. Dada a solubilização do imiquimode, perdas para o meio durante o processamento ou ainda devido à heterogeneidade da deposição do material durante o processo de secagem são evitadas.

Tabela 8 – Eficiência de incorporação do imiquimode nas membranas.

Formulações	Eficiência de incorporação (%)
Quitosana	99,88 ± 1,79 ^a
Alginato	55,41 ± 0,63 ^b
QA 1:1	99,46 ± 0,03 ^a
QA 1:3	99,61 ± 0,10 ^a

Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

Seguindo esta mesma linha de raciocínio, como a solução se alginato não contribui para a solubilização do fármaco, esta potencialmente alcançaria a mais baixa eficiência de incorporação. Já para as formulações QA esperava-se um balanço entre essas propriedades, onde parte do fármaco seria potencialmente solubilizada na matriz devido à presença do ácido acético, muito embora em menor proporção.

Ressalta-se que as membranas de quitosana e de alginato produzidas com os polímeros isolados foram adequadamente solubilizadas, respectivamente, em tampão acetato e tampão citrato. Entretanto, não foi possível desintegrar eficientemente as membranas de formulação QA pela exposição primeiro a 25 mL da solução salina tamponada e, na sequência, a 25 mL de tampão acetato. Ao final da exposição aos solventes, era possível ainda visualizar a presença de quantidades apreciáveis de material em suspensão. Este método deu indícios de que ocorria retenção de cerca de 75% do fármaco adicionado nas membranas do tipo QA, mas como havia grande interferência de materiais insolúveis em suspensão, optou-se por quantificar o fármaco remanescente nas águas de lavagem. Como o fármaco é pouco solúvel nestas soluções, esperava-se que fosse encontrado pouco fármaco nas mesmas, o que se

verificou na prática. Como pode ser observado na Tabela 8, as eficiências de incorporação resultaram em valores muito altos, superiores a 99%, o que contraria a expectativa inicial de que um valor intermediário seria encontrado. Entretanto, estes resultados corroboram com os verificados nas análises por MEV.

Visto que a presença de eventual ácido acético residual nas membranas de todas as formulações contendo quitosana poderia comprometer seu desempenho nos ensaios de atividade biológica, as amostras foram adicionalmente lavadas com tampão HEPES (10 mmol/L e pH 7,4) e a quantidade de fármaco retida em sua estrutura foi também avaliada após este procedimento. É importante mencionar que embora a formulação de alginato não contenha ácido acético, a mesma também foi submetida a esta etapa de lavagem para manter os procedimentos padronizados. O processo de lavagem com o tampão HEPES praticamente não alterou a eficiência de incorporação, ocasionando uma discreta redução para as formulações de quitosana e QA 1:3 (cerca de 6 e 13%, respectivamente), enquanto as demais amostras não apresentaram diferença estatística significativa.

4.6 Cinética de Liberação

Os resultados dos ensaios de cinética de liberação, realizados para todas as formulações conforme os procedimentos descritos no item 3.2.2.6, estão organizados de acordo com o fluido de liberação utilizado, sendo apresentados a seguir de forma sequencial para saliva simulada, solução de tampão acetato e solução salina tamponada.

Nos ensaios realizados, um dos objetivos era determinar o mecanismo envolvido no processo de liberação nestas diferentes soluções. Para isso, utilizou-se a equação de Korsmeyer-Peppas (apresentada na Tabela 2), também conhecida como equação da potência, que relaciona a fração mássica liberada com o tempo (aplicada para razões M_t/M_∞ menores que 0,60, pois após esta faixa pode ocorrer desestabilização conformacional da membrana e mesmo sua solubilização, o que afeta o tipo de mecanismo de liberação).

Visto que se tinha por propósito a recomendação de utilização das membranas pelos pacientes durante o período de sono noturno, para que o tempo de contato fosse maximizado e o potencial desconforto advindo do uso local do filme mucoadesivo fosse menor, os ensaios de liberação foram projetados para que tivessem no máximo 8 horas de duração. Destaca-se que se assumiu como M_∞ em cada caso o valor calculado da massa cumulativa de fármaco disponível para liberação estimada ao final dos ensaios, considerando-se que já se havia atingido o equilíbrio ao final do ensaio. Estes valores não necessariamente coincidem com os

valores teóricos, obtidos a partir da eficiência de incorporação em cada caso.

4.6.1 Saliva simulada

O perfil de liberação do fármaco em saliva simulada pode ser observado nas Figuras 22 e 23. A saliva simulada foi utilizada justamente para se avaliar o comportamento provável das membranas obtidas quando de sua aplicação na mucosa oral, inicialmente com as amostras das membranas livres em solução.

Ao longo da realização do ensaio, foi possível observar um leve intumescimento da membrana, mas esta manteve-se íntegra após o término do experimento.

Realizando-se o ajuste do modelo de Korsmeyer-Peppas aos dados experimentais, obteve-se os valores do expoente difusional (n), da constante difusional (k), os coeficientes de determinação e ainda a quantidade total de fármaco liberado durante o ensaio por massa de filme polimérico utilizado, os quais estão sumarizados na Tabela 9.

Pode-se observar que ambas as formulações de alginato e QA 1:3 (a qual contém maior proporção deste polímero) apresentaram mecanismo de liberação do tipo *quasi-Fickiano*, em que a difusão se dá parcialmente pela matriz e parcialmente através dos poros da matriz intumescida. Isto é condizente com os dados obtidos anteriormente, que mostram que o alginato é capaz de absorver uma grande capacidade de fluido quando neste existem íons livres capazes de interagir com suas cadeias, alterando assim a sua estrutura e incrementando a liberação nesta região.

Já para as formulações de quitosana e QA 1:1, tem-se uma mistura dos mecanismos de liberação devido ao intumescimento da membrana ($n = 1$) e pelo mecanismo de difusão ($n = 0,5$), sendo que este segundo é o principal destas duas membranas, visto que os valores dos ajustes obtidos se aproximam mais do comportamento difusional.

Já quanto à constante difusional (k), quanto maior é o valor obtido, menor é o tempo necessário para a liberação do composto presente na matriz. A partir da análise dos valores obtidos e da comparação com o gráfico de liberação, é possível observar que a membrana de formulação QA 1:3, seguida da membrana de alginato, de fato são as membranas que liberam mais rapidamente o composto, pois nos primeiros 150 minutos de ensaio estas apresentam os maiores valores obtidos. Formulações com maiores valores de constante difusional são mais atrativas para aplicações nas quais se precisa de uma maior resposta inicial.

No entanto, todas as formulações apresentaram liberação limitada, em virtude da presença de grandes barreiras a transferência de massa, como a baixa solubilidade do fármaco

na solução de liberação, e devido à baixa concentração de sais presentes nesta solução, esta não é capaz de intumescer a membrana de maneira eficaz o suficiente para facilitar a liberação do fármaco.

Figura 22 – Liberação de imiquimode das membranas dispersas livremente em solução de saliva simulada, com dados expressos em termos da variação da concentração na solução com o tempo.

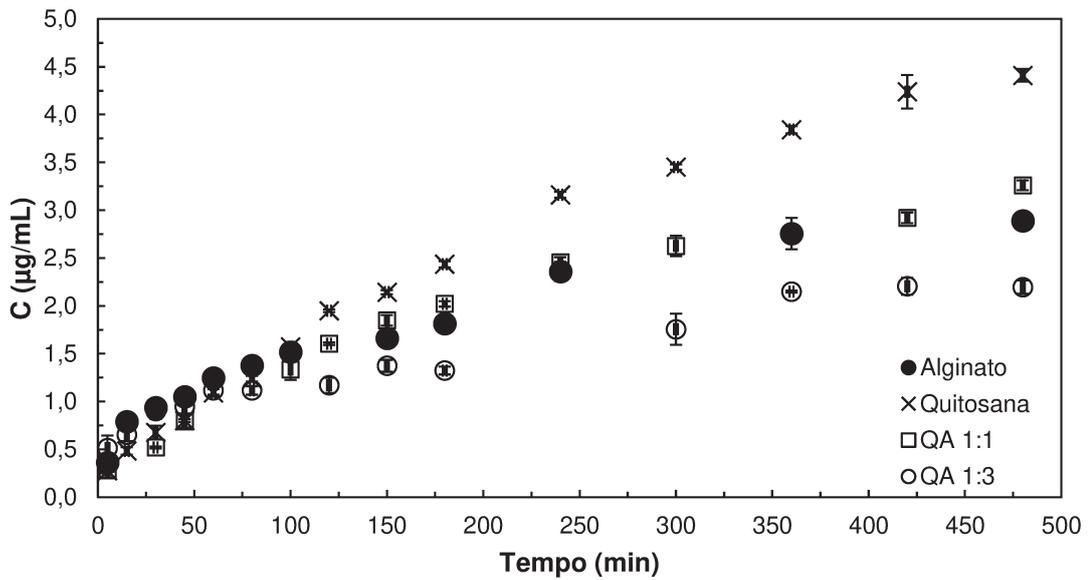


Figura 23 - Fração de imiquimode liberado com o tempo das membranas dispersas livremente em solução de saliva simulada.

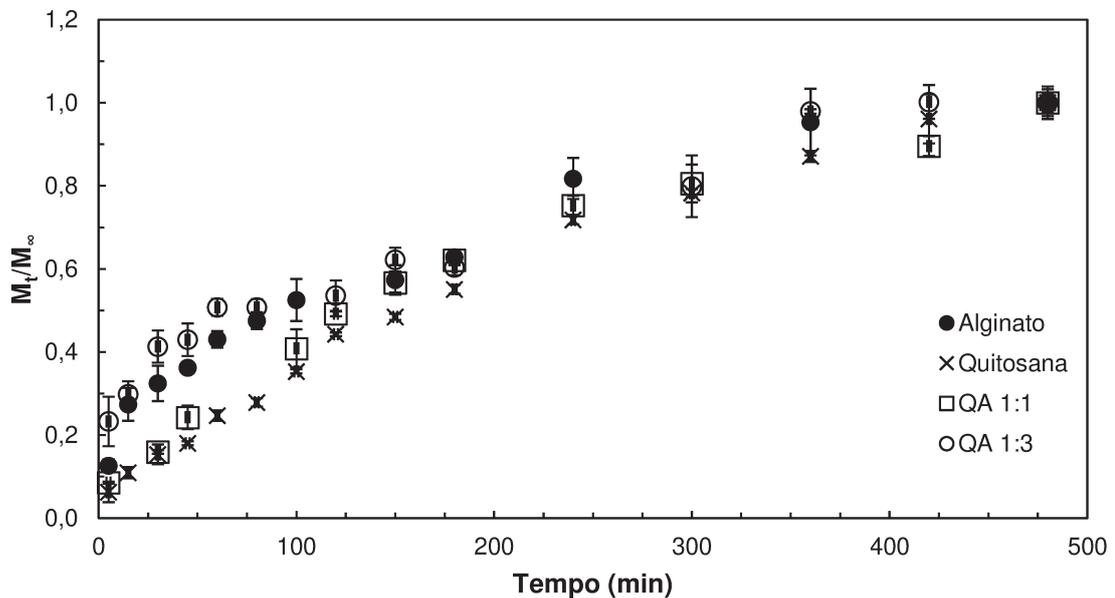


Tabela 9 – Expoente difusional (n), constante difusional (k), coeficiente de determinação (R²), massa total de imiquimode liberada por massa de amostra em presença de solução saliva simulada e concentração final de imiquimode em solução, em sistemas com as membranas dispersas na solução.

Formulação	n	k (s ⁻¹)	R ²	Fármaco liberado por amostra (µg/mg)	C _{final} (µg/mL)
Alginato	0,45 ± 0,13	0,0130 ± 0,0105	0,9571 ± 0,0160	1,99 ± 0,17	2,88 ± 1,20
Quitosana	0,62 ± 0,01	0,0016 ± 0,0001	0,9742 ± 0,0120	2,76 ± 0,27	4,41 ± 1,01
QA 1:1	0,56 ± 0,02	0,0031 ± 0,0009	0,9492 ± 0,0181	1,90 ± 0,26	3,26 ± 0,77
QA 1:3	0,27 ± 0,04	0,0509 ± 0,0162	0,7332 ± 0,0740	1,49 ± 0,10	2,20 ± 1,07

As curvas de ajuste linear podem ser observadas na Figura 24, enquanto os perfis dos ajustes do modelo teórico na Figura 25.

Figura 24 – Curva ln (M_t/M_∞) vs ln(t) para as amostras livres em solução de saliva simulada (tempo expresso em segundos).

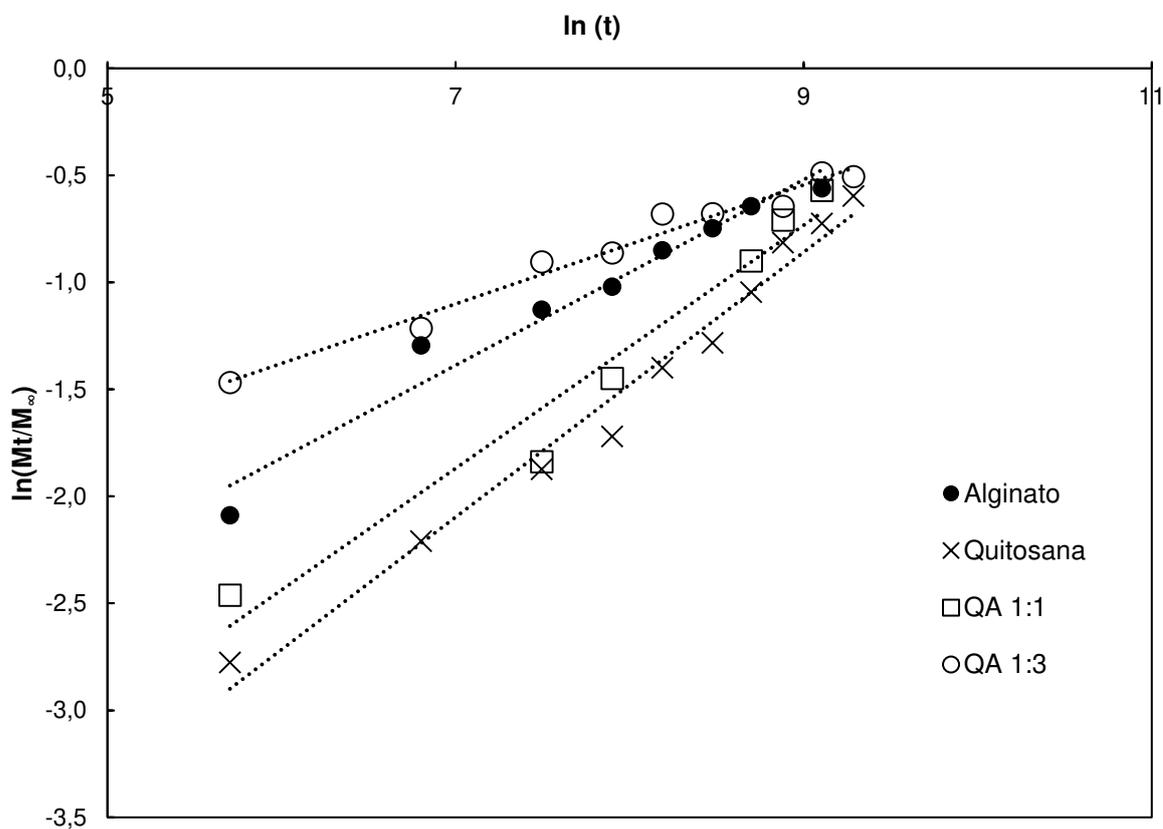
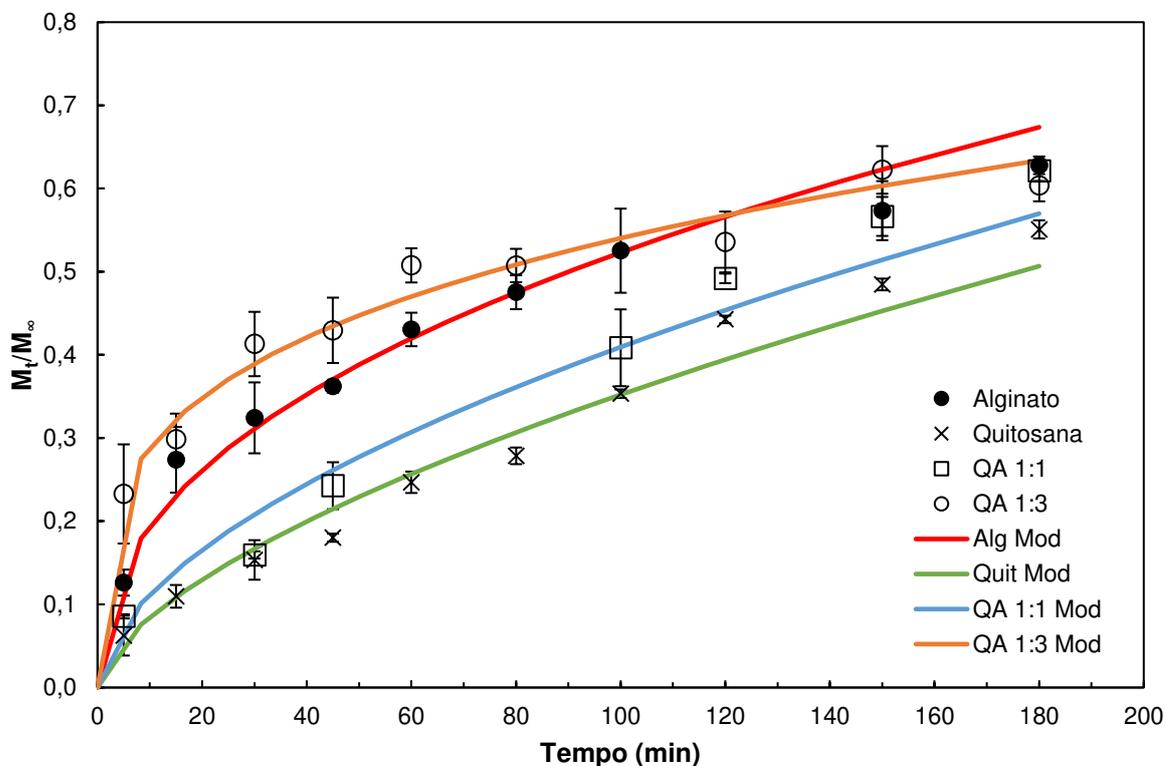


Figura 25 - Ajuste do modelo de Kosmeyer-Peppas para as amostras livres em solução de saliva simulada.

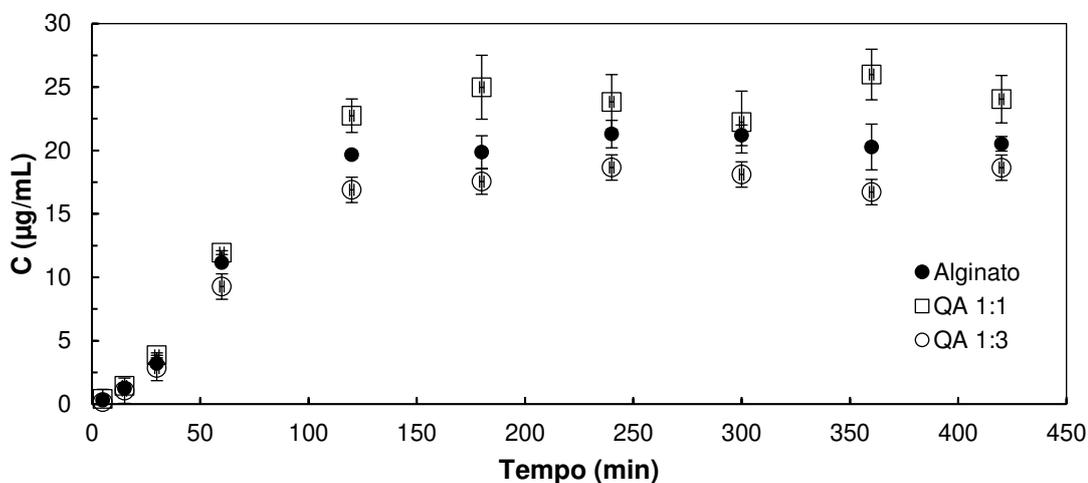


4.6.2 Solução de tampão acetato

Os resultados do ensaio de liberação do imiquimode das membranas expostas ao tampão acetato (amostras livres na solução teste) pode ser observado nas Figuras 26 e 27 e os coeficientes oriundos do ajuste do modelo aos dados experimentais, na Tabela 10. Este ensaio não foi realizado para a formulação de quitosana pois esta dissolveu-se na solução de tampão acetato, como já mostrado na Tabela 6.

A partir da análise do expoente difusional (n) das formulações, é possível observar que nesta solução, todas as formulações apresentam o mecanismo de liberação do tipo Supercaso II, no qual se verifica mecanismos de transporte associados a estresse na matriz polimérica como o desenovelamento das cadeias poliméricas, intumescimento e erosão. Novamente, assim como para a solução salina, a presença de sais e íons livres em solução é responsável pela interação com as cadeias livres de alginato, resultando nessa desestruturação. Supõe-se ainda que, como a membrana de quitosana mostrou-se solúvel neste meio, as cadeias deste polímero, mesmo no complexo, seriam susceptíveis a forte interação com a solução, podendo assim vir até a sofrer solubilização.

Figura 26 - Liberação de imiquimode das membranas livres em solução tampão acetato, com dados expressos em termos da variação da concentração na solução com o tempo.



Outro argumento a respeito dos mecanismos de liberação prevalentes nesta solução relaciona-se ao fármaco. Como pode ser observado, este foi liberado em uma quantidade bem mais expressiva neste meio, visto que o imiquimode é solúvel nesta solução. Como o mecanismo é regido pelas resistências à liberação, o fato dessa solubilidade ser bastante expressiva resulta na redução da resistência de um dos fatores componentes da resistência global, o que pode refletir também na intensidade dos outros mecanismos, visto ainda que essa maior liberação pode vir a desestruturar ainda mais a matriz, deixando-a mais erodida pela saída do fármaco e também pela maior facilidade de solubilização da quitosana nesse meio.

Figura 27 - Fração de imiquimode liberado com o tempo das membranas em tampão acetato.

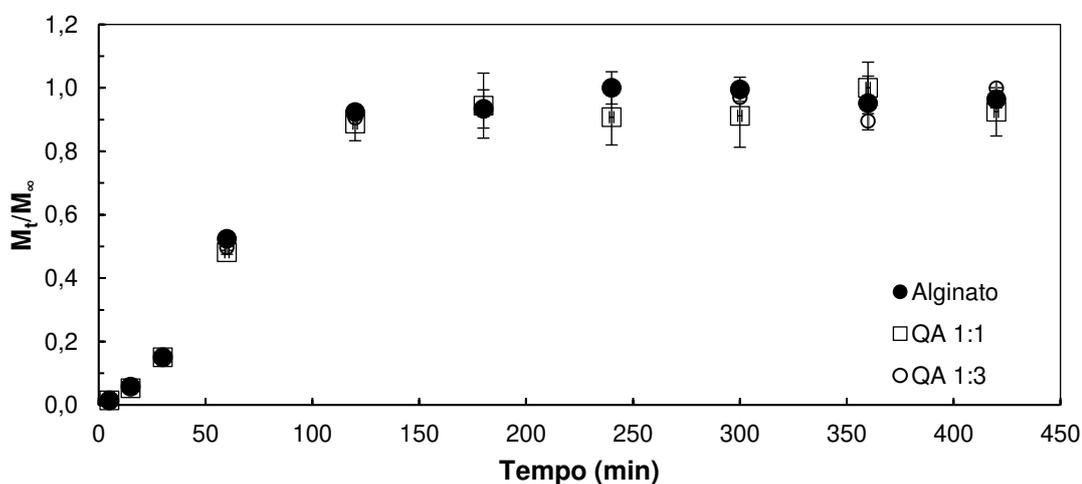


Tabela 10 - Expoente difusional (n), constante difusional (k), coeficiente de determinação (R²) e massa total de imiquimode liberada por massa de amostra em tampão acetato e concentração final de imiquimode em solução. As amostras de membranas estavam livremente dispersas na solução teste.

Formulação	n	k (x10 ⁻⁵ s ⁻¹)	R ²	Fármaco liberado por amostra (µg/mg)	C _{final} (µg/mL)
Alginato	1,42 ± 0,48	0,4 ± 1,5	0,992 ± 0,020	52,69 ± 2,68	20,52 ± 0,57
QA 1:1	1,41 ± 0,08	0,4 ± 0,3	0,999 ± 0,010	62,38 ± 5,06	24,04 ± 1,87
QA 1:3	1,60 ± 0,29	0,1 ± 0,2	0,999 ± 0,003	40,91 ± 2,44	18,64 ± 0,85

As curvas de ajuste linear podem ser observadas na Figura 28, enquanto os perfis dos ajustes do modelo teórico, na Figura 29.

Figura 28 - Curva de $\ln(M_t/M_\infty)$ vs $\ln(t)$ para as amostras livres em solução tampão acetato (tempo expresso em segundos).

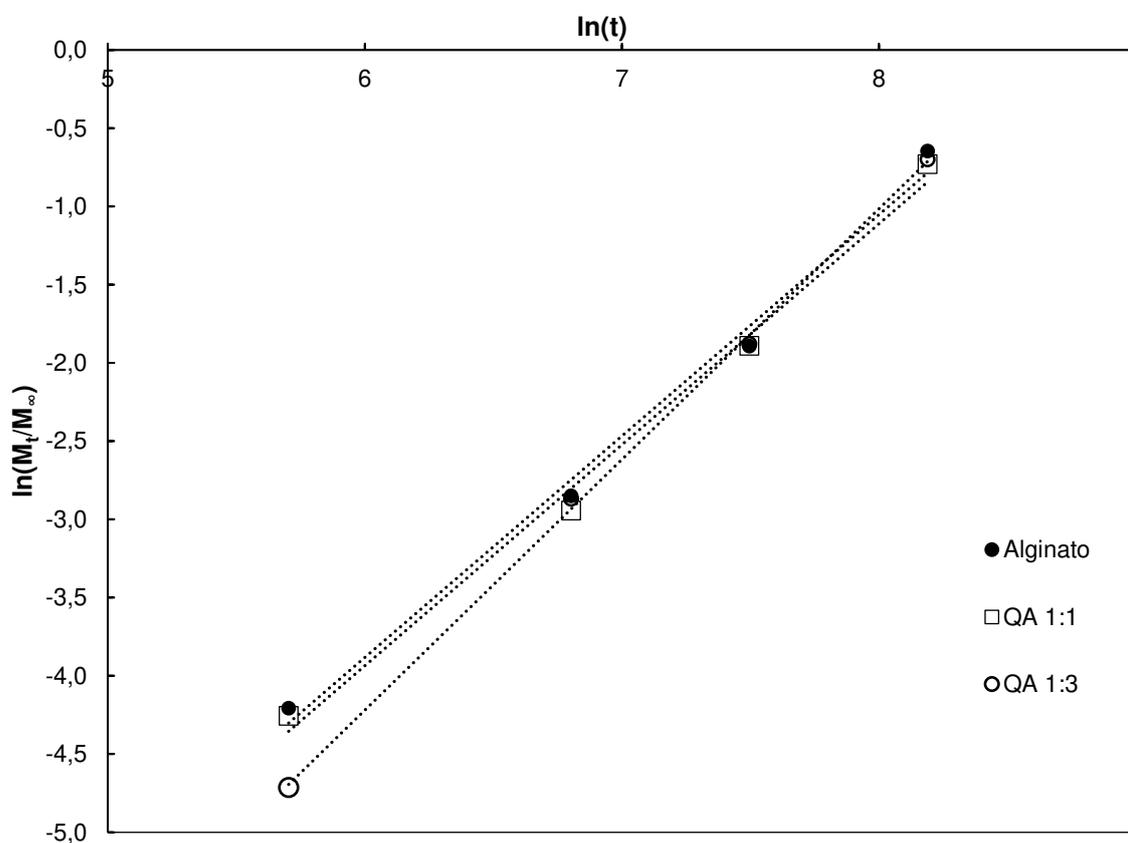
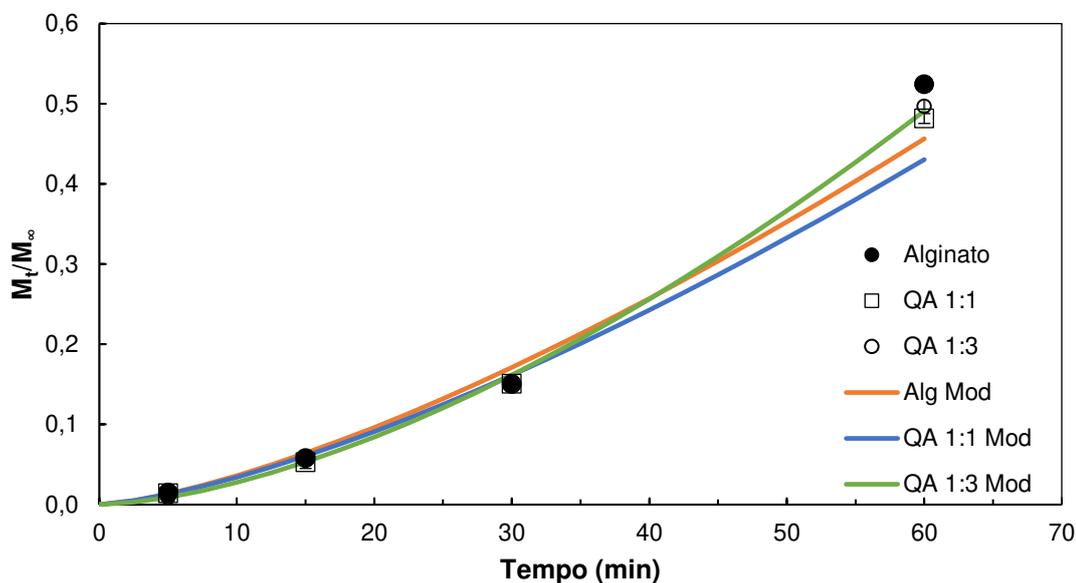


Figura 29 - Ajuste do modelo de Kosmeyer-Peppas para as amostras livres em solução tampão acetato.



4.6.3 Solução salina tamponada

Por recomendação da profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite, decidiu-se também utilizar a solução salina tamponada (Cubayachi et al., 2015), a qual é bastante empregada e similar ao tampão fosfato salino, e que simula também ambientes orais, sendo que estas se diferenciam pela concentração de sais em solução.

Observou-se que as membranas que possuíam alginato em sua composição desintegraram-se em poucas horas quando imersas nessa solução, devido à combinação de agitação e presença de sais, de forma que este ensaio foi descartado. Uma adaptação foi feita, realizando-se o ensaio, nesta solução, para todas as formulações, com as membranas presas na parede do frasco utilizando adesivo acrílico, pois supôs-se que a redução da exposição da membrana a tensões cisalhantes no meio diminuiria as chances de desintegração destas, além de melhor simular uma situação de liberação local na mucosa oral. Os resultados de liberação do imiquimode obtidos nestas condições são mostrados nas Figuras 30 e 31.

As formulações com alginato em sua composição apresentaram, após algumas horas de ensaios, perda de fragmentos dessas membranas e eventuais rasgos com o decorrer do experimento, devido à interação dos sais presentes em solução com o alginato, relaxando as cadeias do PEC, enquanto a formulação de quitosana permaneceu íntegra ao fim do experimento. Observou-se que após o início da fragmentação da membrana, houve um aumento na liberação do imiquimode, devido, provavelmente, à liberação mecânica dos

cristais presos na membrana, que outrora não haviam conseguido superar a barreira de transferência entre os meios, foram agora expostos diretamente à solução, facilitando assim sua dispersão no meio.

Figura 30 – Liberação de imiquimode das membranas presas à parede do frasco e expostas à solução salina tamponada, com dados expressos em termos da variação da concentração na solução com o tempo.

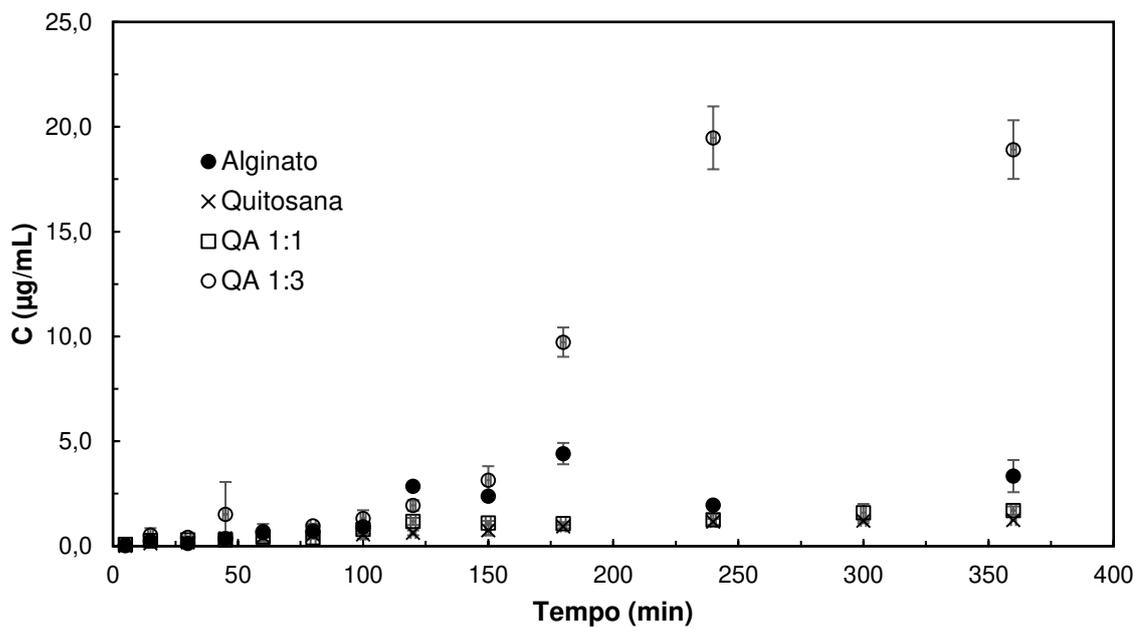
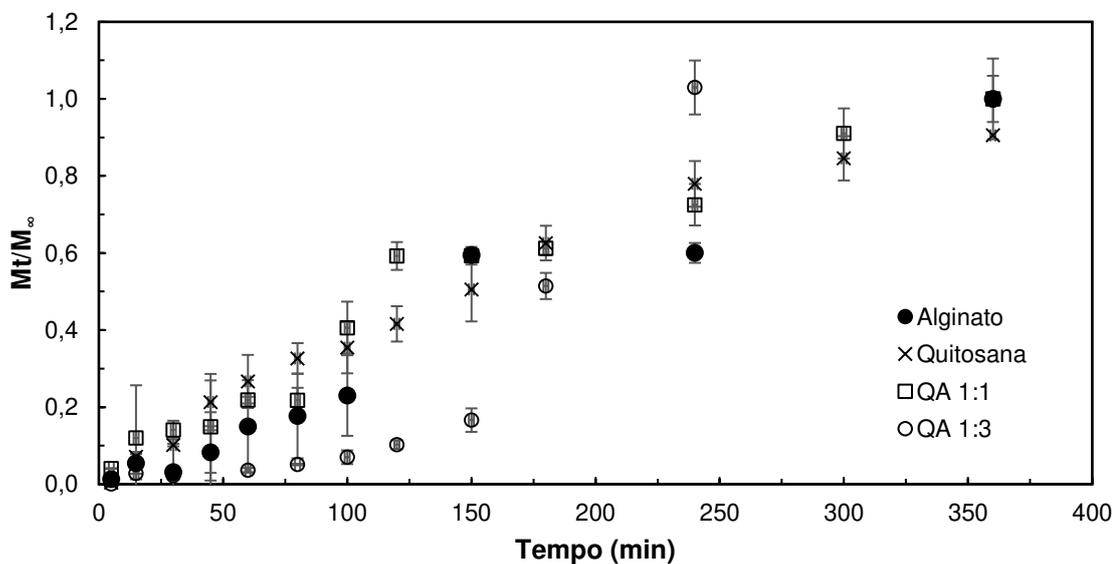


Figura 31 - Fração de imiquimode liberado com o tempo das membranas presas à parede do frasco e expostas à solução salina tamponada.



Os coeficientes resultantes do ajuste do modelo aos dados experimentais estão sumarizados na Tabela 11. Assim como na solução de saliva simulada, as membranas de quitosana e QA 1:1 apresentaram mecanismo de liberação controlado pelo intumescimento da matriz e pela difusão Fickiana. Já as formulações de alginato e QA 1:3, nesta solução, apresentaram o comportamento denominado Supercaso II, no qual se verifica a ocorrência de mecanismos de transporte associados a estresse da matriz polimérica, como por exemplo, intumescimento, desenovelamento de cadeias poliméricas e erosão, o que foi, de fato, observado para estas formulações.

Tabela 11 - Expoente difusional (n), constante difusional (k), coeficiente de determinação (R^2), massa total de imiquimode liberada por massa de membrana em presença de solução salina tamponada e concentração final de imiquimode em solução. As membranas encontravam-se presas à parede do frasco nesse ensaio.

Formulação	n	k ($\times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$)	R^2 (%)	Fármaco liberado por amostra ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	C_{final} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Alginato	$1,40 \pm 0,53$	$1,6 \pm 2,3$	$0,909 \pm 0,038$	$5,17 \pm 1,52$	$4,67 \pm 0,98$
Quitosana	$0,91 \pm 0,01$	$13,1 \pm 2,7$	$0,948 \pm 0,051$	$1,92 \pm 0,36$	$1,88 \pm 0,28$
QA 1:1	$0,78 \pm 0,04$	$44,3 \pm 17,1$	$0,890 \pm 0,038$	$1,48 \pm 0,08$	$2,28 \pm 0,16$
QA 1:3	$1,20 \pm 0,17$	$0,3 \pm 0,2$	$0,836 \pm 0,018$	$19,98 \pm 3,34$	$18,91 \pm 6,25$

Novamente, estes dados corroboram com o comportamento verificado na análise da capacidade de absorção de soluções, visto que a acentuada presença de íons livres nesta solução estimula a interação com as cadeias livres de alginato e assim gera apreciável desestruturação da matriz, fato este, conforme já mencionado, comprovado experimentalmente.

A constante difusional mostra que a membrana de QA 1:1 é a que dá início à liberação mais rapidamente em comparação às demais formulações.

As curvas de ajuste linear podem ser observadas na Figura 32, enquanto os perfis dos ajustes do modelo teórico, na Figura 33.

Figura 32 – Curva $\ln(M_t/M_\infty)$ vs $\ln(t)$ para as amostras presas à parede do frasco e expostas à solução salina tamponada (tempo expresso em segundos).

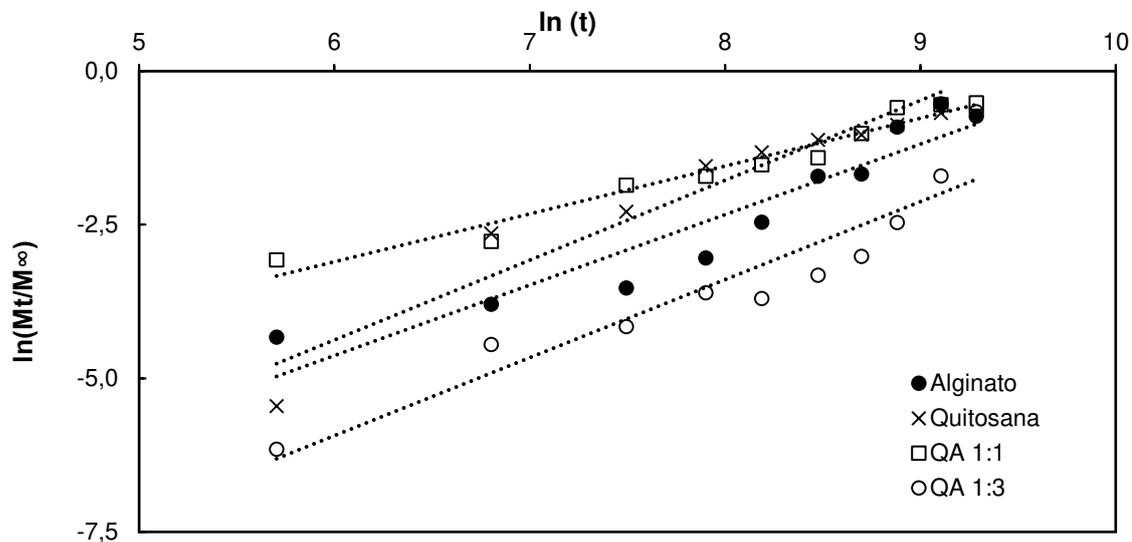
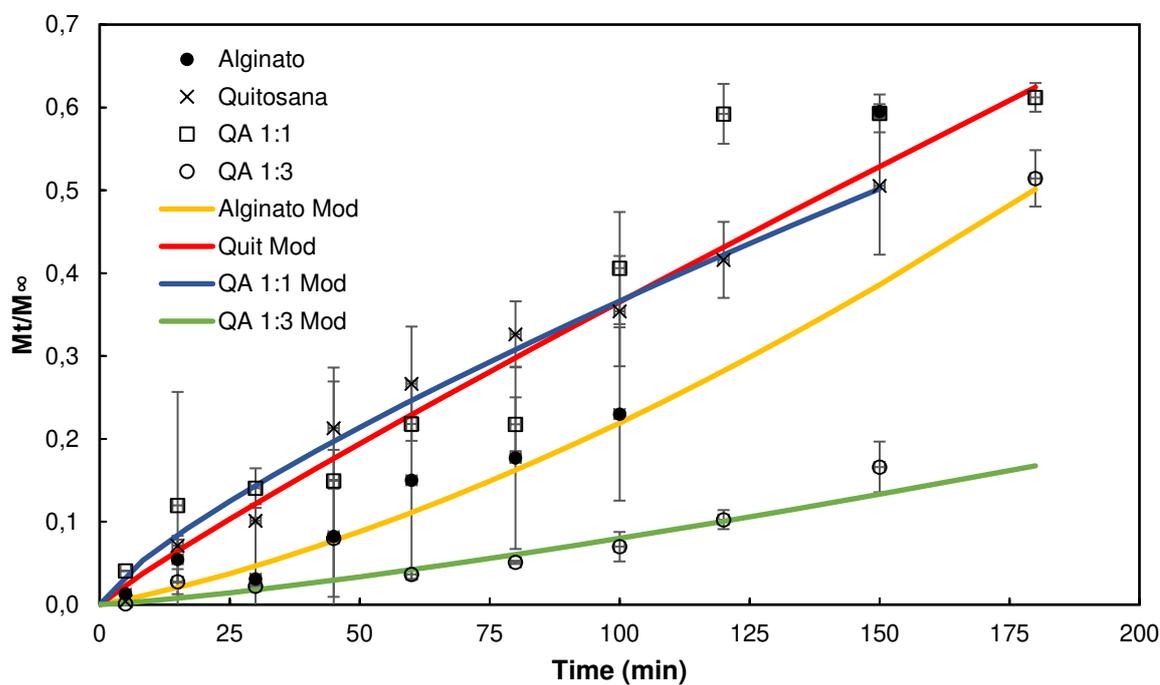


Figura 33 - Ajuste do modelo de Kosmeyer-Peppas para as amostras em solução salina.



4.6.4 Avaliação conjunta dos dados de liberação

As quantidades absolutas (em μg) de fármaco liberado estão apresentadas na Tabela 12, e a razão entre a massa total liberada e a massa total incorporada nas formulações analisadas, na Tabela 13.

Tabela 12 - Massa total de imiquimode liberada em 15 mL de solução de saliva simulada e 50 mL de solução de tampão acetato para as amostras livres em solução.

Membrana	Massa de imiquimode (μg)
	Saliva simulada
Alginato	$43,3 \pm 1,8^{\text{A,a,c}}$
Quitossana	$66,2 \pm 7,2^{\text{b}}$
QA 1:1	$48,9 \pm 1,50^{\text{A,a}}$
QA 1:3	$33,0 \pm 1,4^{\text{A,c}}$

Média \pm desvio padrão das repetições. Médias com letras minúsculas iguais em cada coluna e letras maiúsculas iguais em cada linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 13 – Razão entre a massa total liberada (M_{∞}) e a massa teoricamente disponível para liberação em cada uma das formulações ($M_{\text{teórico}}$) para as amostras livres em solução.

Membrana	$M_{\infty}/M_{\text{teórico}}$ de IQ nas soluções
	Saliva simulada
Alginato	$0,08 \pm 0,01$
Quitossana	$0,05 \pm 0,01$
QA 1:1	$0,05 \pm 0,01$
QA 1:3	$0,04 \pm 0,01$

Como o imiquimode é solúvel em poucas soluções, uma delas sendo o tampão acetato (aproximadamente 2 mg/mL), achou-se pertinente analisar seu comportamento neste meio, mas como este não representa um fluido simulador dos locais de utilização do sistema, buscou-se outras soluções representativas.

A escolha da composição de uma solução que representasse satisfatoriamente saliva foi controversa, visto que há extensa literatura a respeito, mas grandes variações nas formulações apresentadas por diferentes autores, optando-se pela solução de saliva simulada expressa em 3.2.2.4, pois esta era indicada para a simulação de tecido oral.

No entanto, como pode ser observado na Tabela 13, a liberação na solução de saliva simulada mostrou-se pouco eficiente, visto que a presença de poucos sais em solução não foi capaz de propiciar o intumescimento suficiente das membranas, e o meio onde o fármaco é pouco solúvel dificulta a transferência de massa.

Sob orientação do grupo de pesquisa da profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite, empregou-se também uma solução salina tamponada (Cubayachi *et al.*, 2015), bastante similar ao tampão fosfato salino, e que simula também ambientes orais, sendo que se diferenciam pela concentração de sais em solução. No entanto, este ensaio foi realizado com as membranas presas na parede do vidro em contato com a solução, diferindo dos demais na área de liberação em contato com o meio, alterando as propriedades de transferência de massa. O motivo desta escolha foi proveniente da observação experimental de desintegração das membranas neste meio quando livres (como no ensaio de eficiência de incorporação) em conjunto com a possibilidade de simulação do uso em tecido mucoso, onde a amostra fica com um lado em contato com o meio e o outro preso.

Embora as formulações também não tenham apresentado grandes valores de fármaco total liberado para esta solução, como pode ser observado na Tabela 14, estes foram superiores à solução de saliva simulada (Tabelas 12 e 13), em especial a formulação QA 1:3, pois a maior presença de sais foi suficiente para desestruturar a matriz e facilitar a liberação.

Entretanto, estes resultados mostraram-se inferiores aos obtidos por Donnelly *et al.* (2006). Ao analisarem a liberação utilizando o creme comercial Aldara[®], os autores conseguiram uma liberação de 2 mg de fármaco, em célula de Franz de 10 mL através de ensaio de permeação, no qual o meio receptor escolhido foi tampão acetato.

Contudo, segundo Ramineni *et al.* (2013b), diversos estudos de permeabilidade de compostos através da camada epitelial demonstraram maior permeação com aumento da lipofilicidade do fármaco. Assim, muito embora a liberação em solução aquosa possa não ter sido tão eficiente, o contato com a camada epitelial lipofílica pode auxiliar a transferência de massa.

No caso específico da mucosa bucal, como sua permeabilidade é de 4 a 4000 vezes superior à da pele (Ramineni *et al.*, 2013b), teoricamente, são necessários valores de liberação bastante inferiores quando comparados à carga do creme à base de imiquimode disponível comercialmente, Aldara[®], aproximadamente 10 vezes maior que a deste trabalho. Segundo Donnelly *et al.* (2006), aproximadamente 25 cm² desse creme, na espessura de aplicação indicada pelo fabricante, apresenta uma liberação de aproximadamente 2,0 mg após 6 horas de liberação em uma célula de Franz, como descrito anteriormente. Assim, é possível notar que embora as formulações produzidas no presente trabalho tenham uma carga de fármaco inicial de até dez vezes menos que a presente no creme, a liberação é suficientemente alta, e, considerando as condições de permeabilidade, provavelmente adequada para a finalidade proposta.

Tabela 14 - Massa total de imiquimode liberada e razão entre a massa total liberada (M_{∞}) e a massa teoricamente disponível para liberação em cada uma das formulações ($M_{\text{teórico}}$). Neste ensaio, as membranas encontravam-se presas à parede do frasco e expostas à solução salina tamponada.

Membrana	Massa de imiquimode (μg)	$M_{\infty}/M_{\text{teórico}}$ de IQ nas soluções
Alginato	$95,0 \pm 35,3$	$0,22 \pm 0,06$
Quitosana	$28,27 \pm 4,21$	$0,03 \pm 0,01$
QA 1:1	$30,6 \pm 5,1$	$0,04 \pm 0,01$
QA 1:3	$423,4 \pm 197,6$	$0,52 \pm 0,09$

Savage *et al.* (1996), em um estudo clínico, investigaram a tolerância, toxicidade e efeitos biológicos que a administração oral diária de imiquimode exerceu sobre 21 pacientes com cânceres refratários (que não respondem a tratamento). Os autores observaram que a dosagem de 25 mg por paciente não apresentou toxicidade significativa, enquanto dosagens superiores, variando de 50 a 200 mg, resultaram em toxicidade significativa, demonstrando é necessário cuidado no uso desta medicação para que não se supere o valor de 50 mg diárias. No âmbito deste trabalho, as quantidades obtidas são bastante inferiores ao limite de toxicidade.

4.7 Determinação da mucoadesividade da membrana

Conforme pode ser observado na Tabela 15, as membranas não apresentaram diferenças estatísticas significativas a 95% de confiança quanto ao trabalho mucoadesivo, e quanto à força mucoadesiva, apenas a quitosana e a QA 1:3 com imiquimode apresentaram diferença significativa.

Visto que a medição desta propriedade apresenta diversas dificuldades, dado que os parâmetros experimentais pré-selecionados apresentam grande influência nos resultados obtidos (tais como força de contato, tempo de contato e velocidade do pistão), este tipo de ensaio apresenta problemas de reprodutibilidade. Nota-se na literatura grande variabilidade acerca destes parâmetros, o que dificulta a comparação dos resultados e o uso deste ensaio para a determinação da mucoadesividade como uma propriedade absoluta e intrínseca do material (Morales e McConville, 2011). Enquanto o presente trabalho foi realizado utilizando-se força de contato de 0,50 N (módulo da força exercida por um dedo), tempo de contato de

30 s e velocidade do pistão de 1 mm/s, Ramineni (2014) utilizou 10 N, 120 s e 0,1 mm/s respectivamente. Já Donnelly *et al.* (2006) utilizaram 5 N, 30 s e 0,1 mm/s, enquanto Luo *et al.* (2008) utilizaram 0,1 N, 300 s e 1 mm/s.

Tabela 15 – Força máxima e trabalho mucoadesivo das membranas.

Formulação	Força máxima (N)	Trabalho (N.mm)
Alginato	0,0185 ± 0,0034 ^{a,b}	1,022 ± 0,203 ^a
Alginato + IQ	0,0235 ± 0,0050 ^{a,b}	0,858 ± 0,197 ^a
Quitosana	0,0217 ± 0,0050 ^b	0,816 ± 0,152 ^a
Quitosana + IQ	0,0246 ± 0,0079 ^{a,b}	0,976 ± 0,369 ^a
QA 1:1	0,0318 ± 0,0120 ^{a,b}	0,930 ± 0,132 ^a
QA 1:1 + IQ	0,0309 ± 0,0099 ^{a,b}	0,992 ± 0,350 ^a
QA 1:3	0,0276 ± 0,0031 ^{a,b}	0,855 ± 0,165 ^a
QA 1:3 + IQ	0,0333 ± 0,0080 ^a	0,892 ± 0,132 ^a

Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

A propriedade de mucoadesividade de sistemas poliméricos utilizando quitosana (e de alguns empregando alginato também) tem sido foco de estudo de diversos grupos de pesquisa visto seu extenso potencial de aplicação (Abruzzo *et al.*, 2013; Denora *et al.*, 2016; Kulkarni *et al.*, 2016; Sabitha, Vijaya Ratna e Ravindra Reddy, 2010), visto que estes sistemas, utilizados tanto no formato de filmes quanto de micropartículas, apresentam propriedades mucoadesivas apreciáveis. Como no presente trabalho o ensaio não apresentou diferenças estatísticas a um nível de confiança de 95% entre as formulações com e sem o fármaco, pode-se inferir que estas formulações também são, portanto, mucoadesivas.

4.8 Propriedades mecânicas

Quanto às propriedades mecânicas, as membranas apresentaram valores variados de tensão de ruptura e limitado alongamento, segundo os dados registrados na Tabela 16.

Pode-se observar que a formação do PEC através das interações entre as cadeias poliméricas reduz a tensão de ruptura do material, pois os materiais isolados (quitosana e alginato) têm valores significativamente mais altos quando isolados do que as formulações de

QA 1:1 e 1:3, que não diferem significativamente entre si.

Já quanto ao alongamento, o filme de alginato é o que possui maior resultado, e o de quitosana o menor. Assim, como esperado, as formulações dos PECs com proporções intermediárias possuem alongamento na ruptura com valores também intermediários, sendo que a QA 1:1 apresenta valores sem diferença estatística da quitosana. Já para o filme de QA 1:3, o resultado aproxima-se do valor do verificado para o alginato.

Quando o fármaco foi adicionado, este resultou em uma significativa redução da tensão de ruptura para quase todas as formulações, o que se deve ao provável enrijecimento e encolhimento da estrutura da matriz, com exceção da QA 1:1, para a qual houve um pequeno aumento da tensão de ruptura com a adição do fármaco, mas sem diferença estatística a 95% de confiança. Já o alongamento na ruptura aumentou com a adição do fármaco para as membranas de quitosana e QA 1:1, enquanto as formulações compostas majoritariamente ou unicamente de alginato sofreram uma pequena redução, de pouca significância.

Segundo Wang *et al.* (2002), a tensão de ruptura da pele é, normalmente, da ordem de 2,5 a 16 MPa, portanto, para esta aplicação, as membranas com fármaco devem ser utilizadas em superfícies da pele com tensão da ruptura compatíveis. Já quanto à aplicação bucal, segundo Goktas, Dmytryk e McFetridge (2011), a tensão de ruptura da mucosa bucal e demais regiões do interior da boca, é da ordem de 1,06 a 3,94 MPa, portanto para esta aplicação, quaisquer formulações de membrana seriam compatíveis.

Tabela 16 – Tensão de ruptura e alongamento das membranas.

Formulação	Tensão de Ruptura (MPa)	Alongamento (%)
Alginato	50,16 ± 18,45 ^a	3,62 ± 1,49 ^a
Alginato + IQ	11,91 ± 7,46 ^{b,c}	3,39 ± 1,45 ^{a,b}
Quitosana	64,17 ± 18,36 ^a	1,65 ± 0,93 ^b
Quitosana + IQ	4,75 ± 2,42 ^c	2,32 ± 0,68 ^{b,c}
QA 1:1	16,43 ± 6,62 ^b	1,77 ± 0,49 ^{a,c}
QA 1:1 + IQ	18,25 ± 5,71 ^b	2,38 ± 0,66 ^{a,b}
QA 1:3	19,38 ± 6,47 ^b	2,97 ± 0,77 ^{a,b}
QA 1:3 + IQ	9,12 ± 5,09 ^{b,c}	2,27 ± 0,94 ^{a,b}

Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

Como visto no item 2.3, Ramineni *et al.*, (2013b) produziram filmes de blendas de PVP e CMC contendo imiquimode, e obtiveram valores de tensão de ruptura da ordem de 2,1 a 4,2 MPa, e alongamento na ordem de 129 a 400%. É possível notar que esta blenda produziu filmes com menor tensão de ruptura, no entanto, bastante elásticos, devido ao comportamento sob tensão destes polímeros, os quais ao invés de romperem rapidamente, alongam-se.

Segundo a literatura, membranas de QA 1:1 apresentam resistência à tensão de ruptura por volta de 6 a 31 MPa (Bueno *et al.*, 2014; Pires e Moraes, 2015; Rodrigues *et al.*, 2008), enquanto as de QA 1:3 por volta de 60 MPa (Bierhalz e Moraes, 2016). Nota-se que a primeira se encontra dentro da faixa observada, já a segunda mostrou-se bastante menor que a encontrada na literatura. Como esta segunda formulação apresentou uma espessura maior que a encontrada pelas autoras, e esta é inversamente proporcional à tensão de ruptura, uma redução neste valor era de fato esperado.

Já os dados de alongamento na ruptura encontrados na literatura, por volta de 5% (Bierhalz e Moraes, 2016), mostraram-se também superiores aos dados experimentais aqui reportados, provavelmente devido a pequenas diferenças nas formulações das membranas, como a adição de solução aquosa de CaCl₂ a concentrações diferentes. Outro fator que pode ter afetado os resultados foi a utilização do sistema de desaeração a base de bomba à vácuo, o qual apresentou diversos problemas durante o trabalho, resultando na presença de algumas bolhas em certas membranas, as quais podem afetar as propriedades mecânicas.

Meng *et al.* (2010) analisaram as tensões de ruptura e os alongamentos na ruptura para membranas de quitosana e alginato de variadas proporções, desde os compostos isolados a proporções intermediárias de 3:7, 1:1 e 7:3. Para estes, os autores encontraram valores nas faixas de 36 a 52 MPa e 5,3 a 8,4%, respectivamente.

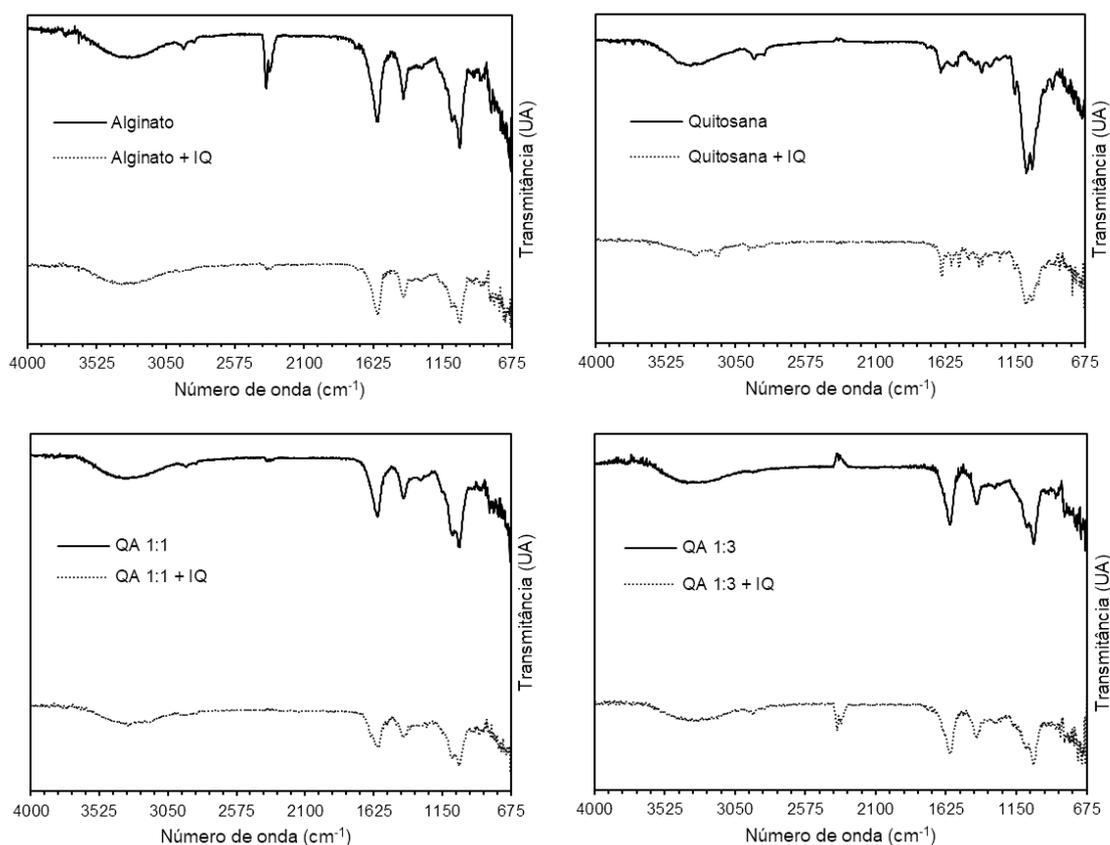
Bombaldi de Souza, Bombaldi de Souza e Moraes (2017) avaliaram a influência da umidade relativa nas propriedades de tensão de ruptura e alongamento para membranas de quitosana e alginato quando combinados. O aumento da umidade relativa até 75% não afetou os valores nem de tensão de ruptura nem de alongamento, enquanto para o valor de 89% a tensão é reduzida para quase um terço de seu valor original, enquanto que com a membrana completamente úmida, este fica ainda menor. Já quanto à propriedade de alongamento das membranas, para o valor de 89% de umidade tem-se um pequeno aumento, enquanto que com as membranas completamente úmidas, o alongamento fica maior ainda, quase 5 vezes mais elevado que o original.

4.9 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Com o intuito de avaliar possíveis interações entre os polímeros e o fármaco nas formulações, foi realizada a análise dos biomateriais por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Esta análise resultou nos espectros compactados nas Figuras 34 e 35.

A partir destes dados foi possível elaborar a Tabela 17, a qual sumariza os principais picos encontrados para o fármaco imiquimode, identificando o grupo funcional e tipo de vibração (Pavia *et al.*, 2015; Sankalia *et al.*, 2007) ali presentes.

Figura 34 - FTIR das formulações de membranas com e sem imiquimode.



Todos os filmes produzidos apresentaram uma banda significativa na região de 3600-3000 cm⁻¹, aproximadamente. Segundo Pavia *et al.* (2015) esta pode ser atribuída ao estiramento dos grupos hidroxila presentes tanto na estrutura da quitosana, quanto do alginato e de seus complexos. Em 2900 cm⁻¹ observa-se os estiramentos dos grupos metil e metileno, presentes em todas as formulações (Sankalia *et al.*, 2007). É possível observar ainda o pico característico do grupamento amina (1540 e 1570 cm⁻¹) na quitosana, carboxila (1420 e 1595

cm^{-1}) do alginato e também a presença dos grupamentos amina no imiquimode (1640 a 1550 cm^{-1}) isoladamente. Quanto estes estão combinados no PEC, novamente são expressos picos vibracionais na região de 1640 a 1540 cm^{-1} , mas não é possível especificar de que grupo tal vibração é derivada, visto que seus componentes isolados possuem uma faixa superposta quando agrupados.

É possível observar ainda que a adição do fármaco não resultou em diferenças significativas nos espectros, sendo estes bastante semelhantes com os da respectiva formulação sem droga, o que permite pressupor que a droga e os polímeros provavelmente não sofreram grandes interações, ou que esta técnica sozinha não é suficiente para determinar esta possível interação (Lawrie *et al.*, 2007).

Figura 35 – FTIR do imiquimode.

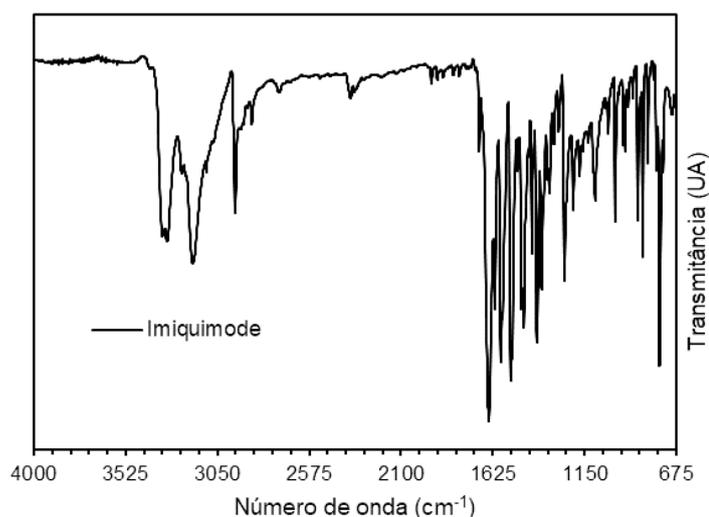


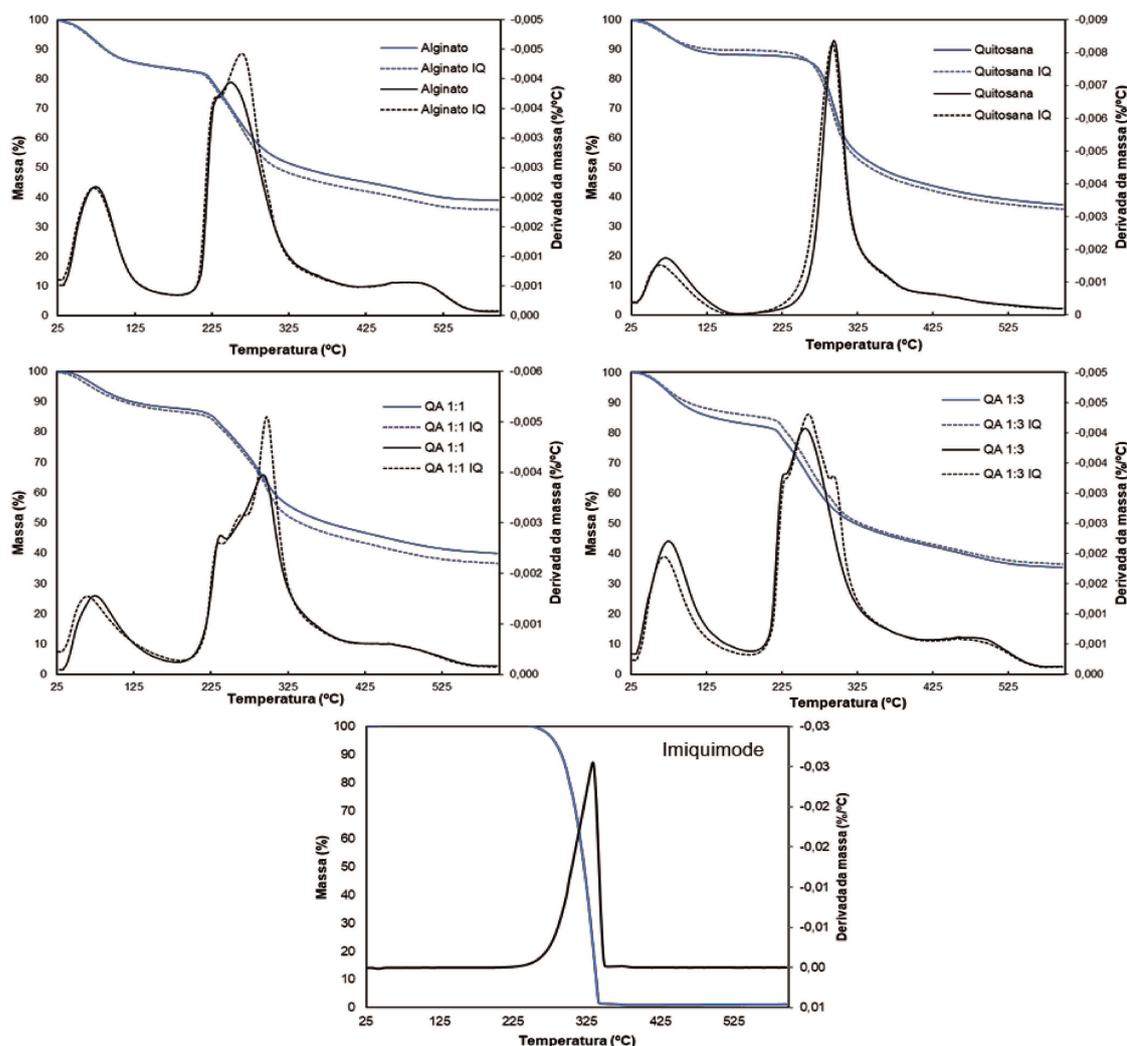
Tabela 17 – Picos presentes no imiquimode.

Pico (cm^{-1})	Grupo	Tipo de vibração
760	-C-H	Fora do plano
1450 a 1370	-CH ₃	Dobramento
1465	-CH ₂ -	Dobramento
1640 a 1550	Aminas	Dobramento
3000 a 2850	-CH ₃	Estiramento
3100 a 3400	Aminas	Estiramento

4.10 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das formulações produzidas e do fármaco isolado foi analisada por análise termogravimétrica (TGA), e os resultados alcançados estão expressos na Figura 36 e na Tabela 18. Na Figura 36 optou-se por apresentar dados tanto da variação da massa quanto da derivada da massa com a temperatura, visando facilitar a identificação dos eventos térmicos (Canevarolo Jr, 2007). Os gráficos foram representados de modo que o eixo da derivada da massa pelo tempo está invertido para facilitar a visualização das curvas. Na Tabela 18 estão sumarizados os valores dos picos dos quatro principais eventos térmicos encontrados.

Figura 36 - Termogramas das membranas de alginato, quitosana, QA 1:1, QA 1:3 com e sem imiquimode (IQ) e termograma do imiquimode, nos quais os dados numéricos das curvas em azul estão indicados no eixo vertical esquerdo, e as curvas em preto, no eixo vertical direito.



É possível observar que a presença do imiquimode gera um pequeno deslocamento em relação aos eventos presentes nas membranas que não o contêm. O imiquimode apresenta apenas um evento térmico, referente à sua temperatura de degradação, cujo valor encontrado foi de 333,4°C, valor mais elevado que o encontrado na literatura de aproximadamente 294°C (Pubchem, 2017), possivelmente devido à diferenças na metodologia de realização do ensaio, ou ainda à possibilidade do fármaco utilizado neste trabalho estar em uma possível forma halogenada.

Já as formulações de quitosana e de alginato isolados apresentaram comportamento semelhante, com dois eventos térmicos. O primeiro ocorreu à temperatura inferior à 100°C e pode ser atribuído à perda de água residual contida nas amostras, mesmo após seu armazenamento em dessecador por pelo menos 24 horas. O segundo evento, associado à degradação dos polímeros, aconteceu à 249,3 para o alginato e 293,6°C para a quitosana. Dados similares foram observados por Ferfera-Harrar *et al.* (2014) e Neto *et al.* (2005), respectivamente 298°C e 297,3°C para a quitosana, enquanto Sarmiento *et al.* (2006) e Siddaramaiah *et al.* (2008), relataram, respectivamente, 247,8°C e 235°C para matrizes constituídas de alginato.

A adição do imiquimode a estas duas formulações resultou apenas na mudança dos valores da temperatura na qual ocorreram os eventos. A perda de água residual (primeiro evento) ocorreu a uma temperatura inferior, e a degradação do polímero e da droga (segundo evento) em uma temperatura superior para o alginato e inferior para quitosana. Isto se dá provavelmente devido a interações do tipo ligação de hidrogênio entre as aminas da droga e as aminas da quitosana e grupos carboxila do alginato, diminuindo o número de sítios disponíveis para realização de ligações de hidrogênio com a água presente no interior da membrana, fazendo com que esta fique menos presa em seu interior.

Para as formulações compostas conjuntamente de quitosana e alginato, para ambas as proporções, tem-se três eventos térmicos, onde, novamente o primeiro é referente à perda de água residual, o segundo à degradação do alginato e o terceiro à degradação da quitosana.

Por fim, a adição do fármaco a estas formulações aumenta o número de eventos presentes para quatro, sendo que o último se refere à degradação do fármaco. O fato da adição do fármaco introduzir um novo evento para os complexos polieletrólitos enquanto para os polímeros isolados isso não acontece, pode ser atribuído ao fato de que a droga é capaz de interagir com o polímero isolado em sua formulação, enquanto no complexo polieletrólito, o fármaco tem que “competir” por sítios de interação que nos polímeros isolados estavam livres. No PEC, aminas e carboxilas interagem entre si, ficando assim parte da droga, “livre”.

Outra suposição é que ocorre, além dos polissacarídeos combinados no PEC, a possível presença dos componentes originais livres na membrana, sendo esta, portanto uma mistura composta do PEC e dos polímeros isolados. Portanto, nesse caso, estas formulações apresentariam todas as temperaturas de degradação, inclusive a do fármaco depositado.

Tabela 18 – Eventos térmicos do imiquimode e das formulações poliméricas

Formulação	Temperatura (°C)			
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Imiquimode	333,4	-	-	-
Alginato	74,4	249,3	-	-
Alginato + IQ	71,3	263,8	-	-
Quitosana	70,4	293,6	-	-
Quitosana + IQ	62,9	291,6	-	-
QA 1:1	74,3	237,8	292,9	-
QA 1:1 + IQ	64,7	235,0	265,7	297,4
QA 1:3	74,7	228,4	255,7	-
QA 1:3 + IQ	68,8	226,7	260,2	293,1

Média ± desvio padrão das repetições. Médias com letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) na propriedade estudada de acordo com o teste de Tukey.

Muito embora no ensaio de FTIR não tenha sido possível concluir com certeza se o imiquimode e os polímeros interagem, as alterações nos termogramas resultantes da adição da droga demonstraram que de fato a introdução do fármaco levou a alterações nos dados de todas as formulações.

Visto que todos os filmes produzidos apresentam elevadas temperaturas de degradação (acima de 200°C), a aplicação destes para o tratamento de tumores bucais ou de pele torna-se bastante apropriada, pois as temperaturas atingidas pelo corpo ficam em torno de 37°C, não excedendo a 41°C mesmo em estado febril, o que implica em alta estabilidade térmica dos biomateriais.

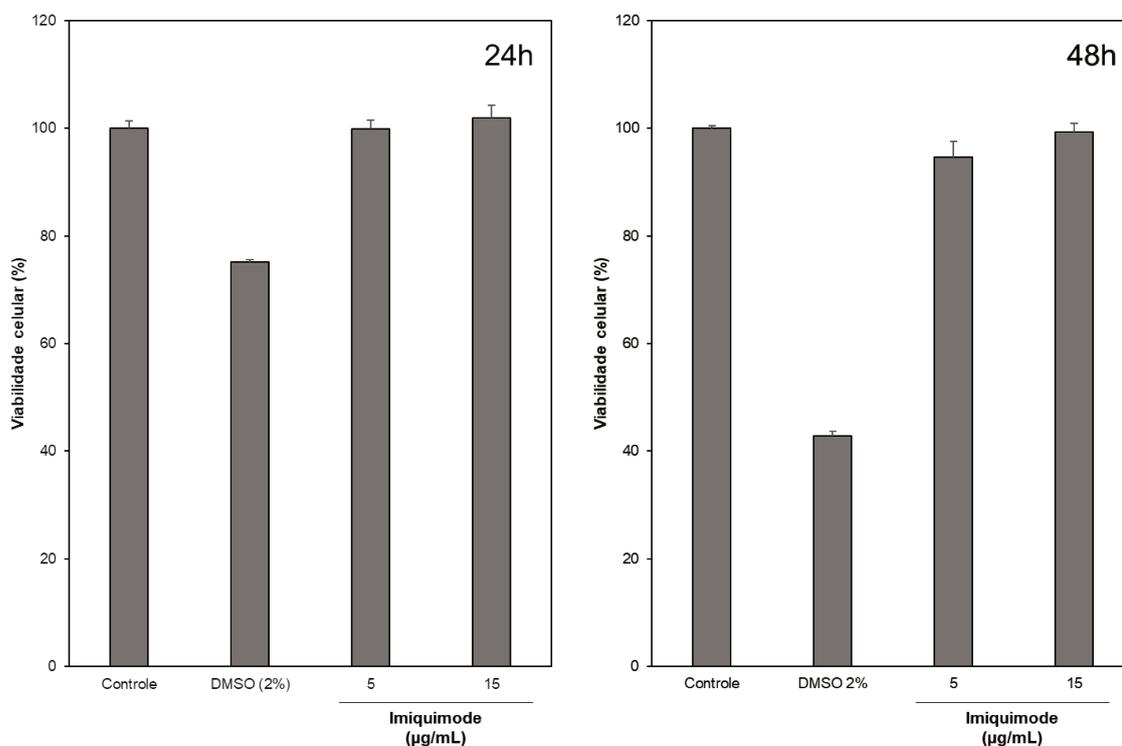
4.11 Ensaios biológicos *in vitro*

4.11.1 Teste de viabilidade celular (*Resazurina ou Alamar Blue*)

O comportamento celular *in vitro* na presença do fármaco livre foi analisado inicialmente para a linhagem celular FaDu, através do ensaio de proliferação e/ou viabilidade com resazurina, nos períodos de 24 e 48 horas. Os resultados podem ser observados na Figura 37.

Nota-se que a linhagem celular proveniente de um CCE não teve sua viabilidade celular alterada pela presença da droga em solução, resultado este que contrasta com o relatado na literatura por Ahn *et al.* (2012), que observaram a influência do fármaco na viabilidade de forma dependente da concentração. Os resultados apresentados por estes autores devem, no entanto, ser analisados com cautela.

Figura 37 – Viabilidade da linhagem celular FaDu exposta às concentrações de imiquimode de 5 e 15 $\mu\text{g/mL}$ dissolvido em meio de cultura contendo DMSO a no máximo 0,5%, após 24 horas e 48 horas, sendo o controle composto somente de meio de cultura.

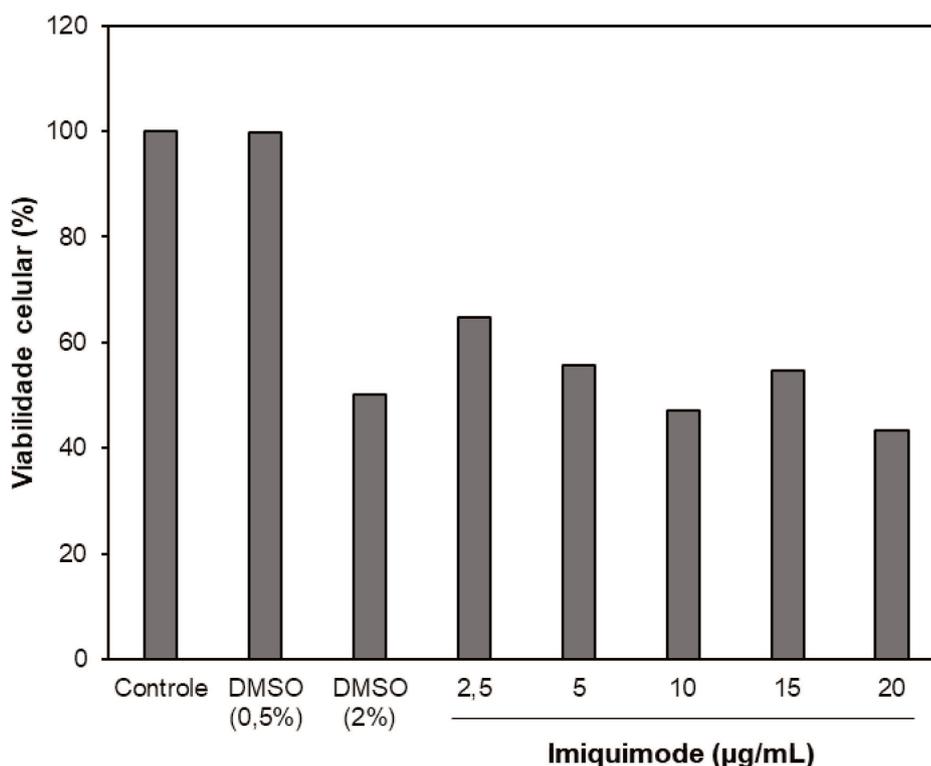


Como mostra a Figura 37, o DMSO é um composto bastante tóxico à linhagem celular, reduzindo aproximadamente 60% da viabilidade quando em concentração de 2% no

meio de cultura utilizado para o cultivo celular. Por este motivo, é recomendada a utilização do valor máximo de concentração deste composto em solução de meio de cultura na proporção de 0,5% v/v. Mas, como os autores utilizaram o DMSO como solvente do imiquimode, no qual a solubilidade é de aproximadamente 4 mg/mL (Sigma-Aldrich, 2017), o DMSO provavelmente foi utilizado em quantidades superiores ao limite recomendado, visto que, para atingir a fração volumétrica máxima de 0,5% de DMSO em meio de cultura, a máxima concentração possível do fármaco é de 20 µg/mL, enquanto os autores utilizaram os valores de 25 e 100 µg/mL. Portanto, os resultados de citotoxicidade descritos pelos autores foram, provavelmente, erroneamente atribuídos ao fármaco somente, quando parte destes provavelmente devia-se à concentração muito elevada de DMSO.

Optou-se também por testar se o imiquimode apresentaria algum efeito sobre células 4T1, uma linhagem de carcinoma mamário murino, altamente tumorigênica e invasiva, e sobre a linhagem HN13, de origem humana e proveniente de um CCE na língua. Na Figura 38 é possível observar os resultados obtidos para a primeira linhagem celular, e na Figura 39, para a segunda linhagem, após serem cultivadas sob diferentes condições.

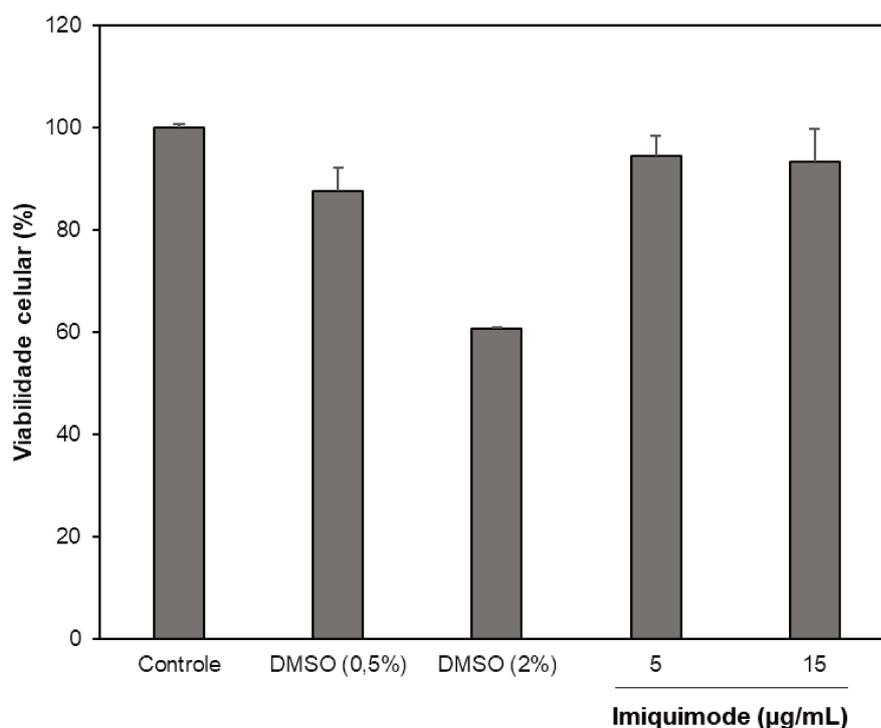
Figura 38 - Viabilidade da linhagem celular 4T1 perante diferentes concentrações de imiquimode em DMSO a 0,5%, após 48 horas.



De modo a garantir que o DMSO não se constituísse em fator interferente nestes resultados, para todas as amostras nas quais se utilizou o fármaco, este foi solubilizado em condições adequadas de modo que a quantidade de DMSO permanecesse constante e igual a 0,5% para todas as diferentes concentrações. Testou-se ainda a influência do DMSO somente nesta proporção, de modo a garantir que qualquer resultado de viabilidade apresentado seria de fato relativo à presença fármaco.

Concluiu-se que a linhagem 4T1 é altamente sensível à presença imiquimode, sendo que na menor das concentrações testadas (2,5 µg/mL) este já reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 40%. Foi possível observar ainda que esta ação é dependente da concentração, pois, com exceção da concentração de 15 µg/mL, quanto maior a concentração, mais foi afetada a viabilidade, atingindo valores de redução de até 60%. Já a linhagem HN13, assim como a FaDu, também não foi afetada diretamente pela presença do imiquimode. O resultado deste cultivo foi apresentado para apenas 24 horas pois houve contaminação da placa após este período.

Figura 39 - Viabilidade da linhagem celular HN13 perante diferentes concentrações de imiquimode em DMSO a no máximo 0,5%, após 24 horas.

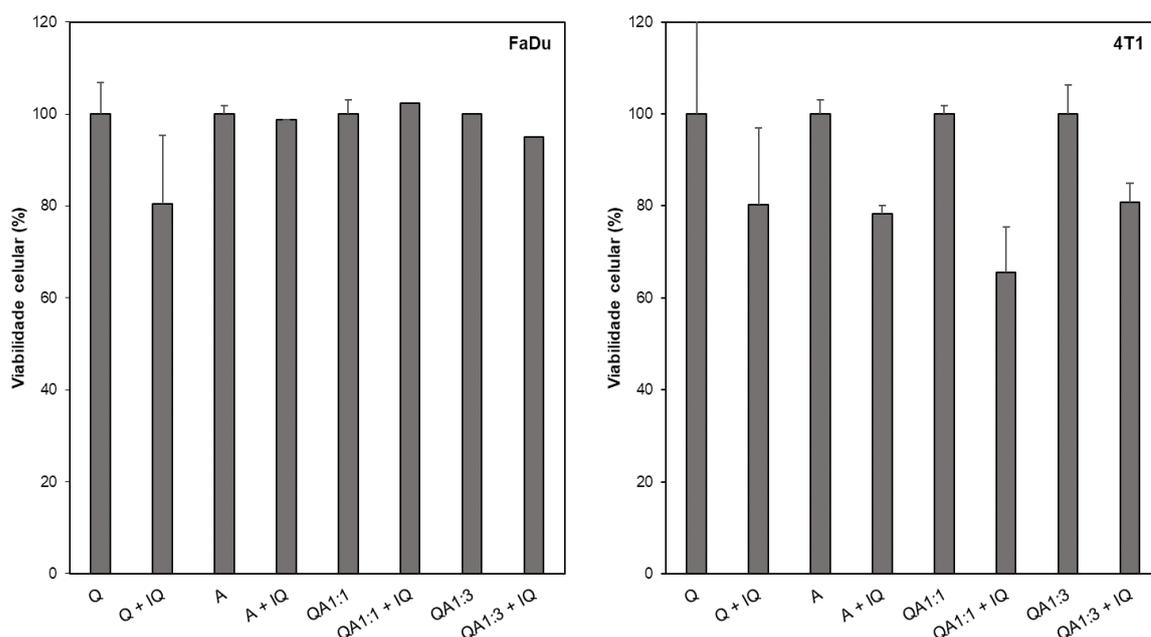


Dada a destoante resposta da linhagem celular 4T1 com as outras duas bastantes similares, decidiu-se testar a viabilidade das linhagens 4T1 e FaDu em presença das

membranas produzidas neste trabalho em suspensão no meio de cultura. Os resultados obtidos estão sumarizados na Figura 40. É importante frisar que cada formulação de membrana sem fármaco foi considerada o controle de cada respectiva formulação correspondente com imiquimode, de modo a avaliar apenas a influência da adição da droga no meio. Não se utilizou, nestes ensaios, DMSO.

Os resultados apresentados para a linhagem FaDu corroboram com os ensaios obtidos para o fármaco livre, e a única formulação a apresentar alguma influência associada à presença do fármaco foi a de quitosana. No entanto, o desvio associado foi grande o bastante para desencorajar a conclusão de efetivo efeito. Paralelamente, a linhagem 4T1 apresentou variabilidade na viabilidade de até aproximadamente 40%, para a formulação de QA 1:1, mostrando que, de fato, como visto anteriormente, o fármaco influenciou nesta variável.

Figura 40 - Viabilidade das linhagens celulares FaDu e 4T1 expostas a diferentes formulações de membrana, após 24 horas, por teste de citotoxicidade direto.

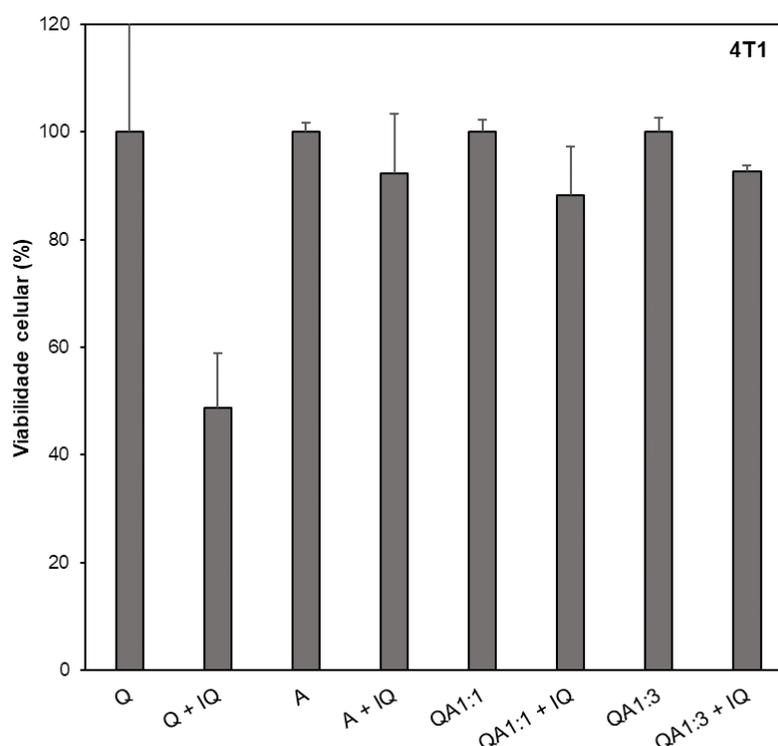


Como no ensaio anterior averiguou-se o comportamento celular na presença direta das membranas, julgou-se válido realizar o teste indireto de viabilidade celular, no qual o efeito apenas do extrato das membranas no desempenho celular é analisado. Assim, as membranas isoladas foram colocadas em contato com o meio de cultura (na ausência de células) por 24 horas e posteriormente, o meio com os compostos extraídos foi transferido para poços contendo células previamente inoculadas e estas foram então incubadas por 24 horas. Com

isso, buscou-se eliminar possíveis influências que a membrana possa ter tido fisicamente nas células, alterando sua viabilidade, desde influenciando a transferência de oxigênio para as células até o fato de exercerem pressão direta na camada celular, resultando em um falso positivo para a influência do fármaco na viabilidade. Estes resultados do ensaio realizado para a linhagem 4T1 podem ser observados na Figura 41.

O ensaio de citotoxicidade indireta mostrou que a formulação de quitosana resultou em maior efeito na redução da concentração de células viáveis. Embora as demais formulações tenham apresentado efeitos citotóxicos, estes foram bastante mais conservadores que os observados no ensaio direto, mostrando que, possivelmente, como visto em outros momentos deste trabalho, as membranas com alginato em sua formulação sofrem uma possível decomposição no meio de cultura que é rico em sais, e portanto talvez ora por interação química, ora por pressão física, estas resultaram em uma maior variação da viabilidade, enquanto a formulação de quitosana, que não sofre grandes variações estruturais neste meio, não apresentou este comportamento, tendo sua grande variação sendo proveniente possivelmente de diferenças pontuais quantitativas de fármaco, problemática relativa à falta de homogeneidade da estrutura.

Figura 41 - Viabilidade da linhagem celular 4T1 exposta a diferentes formulações de membrana em meio de cultura após 24 horas para teste de citotoxicidade indireto.



4.11.2 Análise de proteínas por Western blot

Muito embora a linhagem celular 4T1 tenha apresentado resultados positivos para a influência do imiquimode diretamente na viabilidade celular, a discussão dos prováveis mecanismos de ação do fármaco é bastante ampla, envolvendo diversos sistemas, conforme exemplificado na Revisão da Literatura a partir da análise dos trabalhos de Micali *et al.* (2014) e Jiménez-Baranda, Silva e Bhardwaj (2012).

Uma das principais teorias é a ação da droga perante os receptores do tipo Toll, estimulando a produção de fatores de transcrição central, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B). Este fator é um mediador pleiotrópico de regulação genética indutível e específica, envolvendo diversas atividades biológicas, incluindo resposta imune, inflamação, proliferação e morte celular (Wan e Lenardo, 2009). Assim, a estimulação deste fator leva à uma resposta do sistema imunológico que atua na célula tumoral, estimulando sua necrose ou apoptose. Ou seja, muito embora em baixas concentrações este fármaco não seja citotóxico para o tumor, é possível que sua presença estimule a ação imune e resulte, da mesma maneira, numa possível destruição do tumor, o que não é possível de se analisar em ensaios *in vitro* que exploram exclusivamente a determinação da viabilidade e proliferação celular.

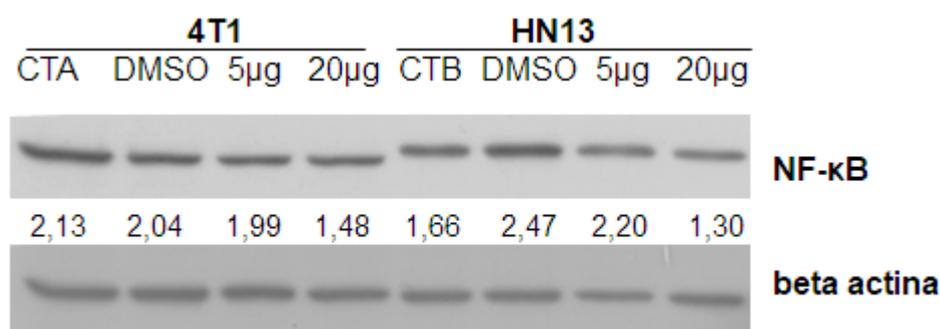
Portanto, decidiu-se realizar o ensaio denominado *western blot*, o qual permite a identificação de algumas proteínas complexas de interesse extraídas da matriz celular, como a NF- κ B, para a linhagem celular 4T1 e para a HN13. Neste, utilizou-se a proteína beta-actina, uma isoforma da actina, envolvida na motilidade, estrutura e integridade celular, como fator constitutivo de referência do ensaio (proteína controle de carregamento), de modo a por meio dos resultados obtidos com ela, normalizar os níveis de proteínas detectados. Isto foi feito através da análise das razões de beta-actina e NF- κ B para cada linhagem, em adição ao registro das respostas absolutas, visando relativizar erros inerentes da técnica, como problemas na quantificação, efeito de borda, entre outros, que dificultam a análise dos resultados diretos oriundos desta abordagem.

Os resultados deste ensaio estão expressos na Figura 42, que mostra a resposta visual e os valores proporcionais densitométricos das respostas, e na Figura 43, na qual se observa os valores absolutos componentes destas razões, para melhor visualização.

É possível observar (Figura 42) que, para ambas as linhagens, a adição do fármaco reduziu a quantidade de proteína NF- κ B no interior das células ao se comparar com o controle consistindo das células tratadas com DMSO. Esta redução mostrou-se, para a linhagem 4T1, dependente da concentração, indicando que o fármaco pode estar de fato modulando a

expressão desse fator nuclear. Essa variação ficou mais evidente para a linhagem HN13, ao se comparar com as células tratadas com DMSO, principalmente para a maior concentração do fármaco, levando à mesma conclusão da outra linhagem, a 4T1. Observa-se que há um aumento da razão na resposta do DMSO para a linhagem HN13 em relação ao controle B, oriundo do aumento da quantidade de NF- κ B. Esse aumento da razão também acontece para quando estas células são tratadas com 5 μ g de IQ, no entanto, é possível observar que ambas apresentam maior quantidade de NF- κ B, resultando no aumento da razão em relação ao controle.

Figura 42 – *Western blot* para as linhagens celulares 4T1 e HN13 e suas razões densitométricas (números entre as bandas para NF- κ B e anti-beta actina), sendo CTA é o controle da linhagem 4T1 e CTB o controle de HN13.



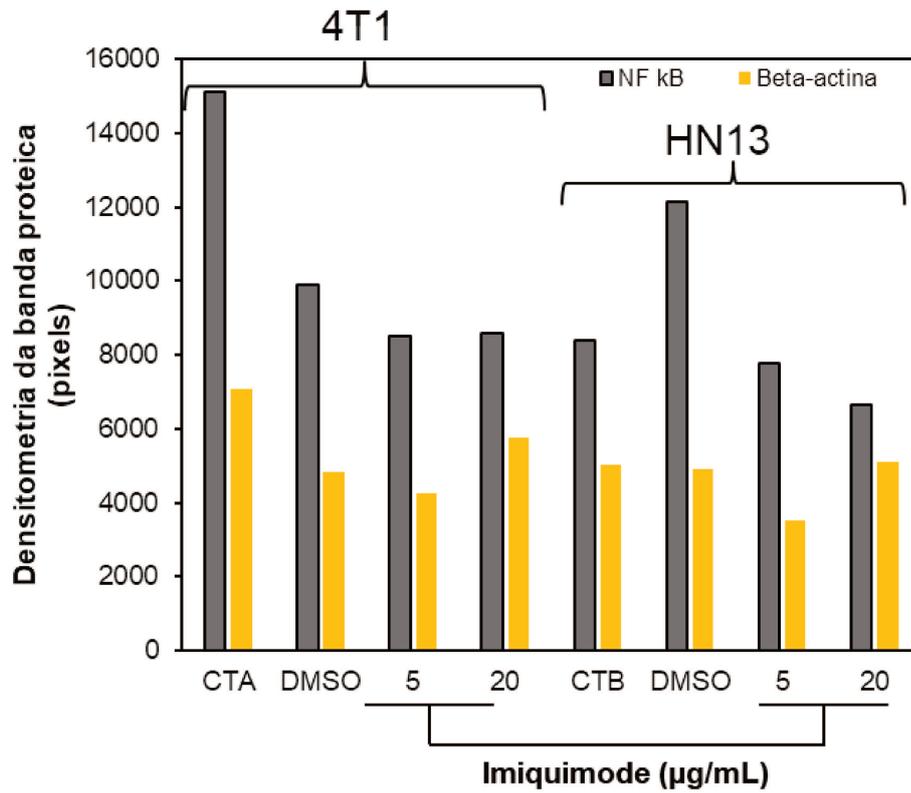
Uma suposição feita é quanto à possibilidade dos valores observados de NF- κ B para o controle serem inferiores ao normal, visto que para a linhagem 4T1 esta apresentou quase o dobro desta leitura, e considerando este inesperado aumento quando do tratamento com DMSO, supõe-se que o controle B apresentaria, normalmente, um valor superior para NF- κ B, devido à possíveis erros experimentais, ou erro de leitura. Isso mostra o quão delicado é este ensaio, e sua natureza semi-quantitativa.

Ainda assim, é possível observar redução em relação ao controle, para ambas as linhagens celulares, para a concentração de 20 μ g de fármaco, e ainda a menor quantidade da proteína NF- κ B, mostrando que este de fato desencadeia uma resposta imune.

Desta forma, muito embora os dados do ensaio de viabilidade celular não tenham apresentado resultados promissores para a ação do fármaco, estes não devem ser considerados como desencorajadores, visto que o mecanismo de ação deste é bastante complexo, e apenas ensaios *in vitro* não conseguem replicar o organismo e a junção de diversos sistemas necessários para que tenha ação antitumoral, sendo requeridos ensaios *in vivo* para a melhor

avaliação da eficácia dos dispositivos no complexo ambiente de sua utilização.

Figura 43 – Densitometria das bandas obtidas de NF-κB e Beta-actina obtidas no *western blot* para as linhagens celulares 4T1 e HN13, onde CTA é o controle da linhagem 4T1 e CTB o controle de HN13.



5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

As membranas de quitosana e alginato preparadas com diferentes proporções mássicas dos dois compostos (de 0 a 3) apresentaram-se íntegras, lisas e homogêneas, como exceção da formulação com QA 3:1, a qual não se mostrou estruturalmente estável, não formando o complexo polieletrólito satisfatoriamente.

Já as formuladas com o antineoplásico imiquimode incorporado apresentaram bolsões de fármaco distribuídos pela estrutura, com exceção da membrana de quitosana, na qual a deposição da droga ocorreu na forma de pequenas fibras brancas dispersas por toda sua estrutura. De uma forma geral, a adição do fármaco resultou em redução do diâmetro, aumento da espessura, da opacidade das membranas e da resistência mecânica, deixando-as mais esbranquiçadas, muito embora todas tenham se mostrado pouco opacas. A formulação que apresentou a maior eficiência de incorporação da droga foi a de quitosana, atingindo o valor de 99,88%. A membrana de quitosana sem fármaco apresentou a maior resistência à tração, e das membranas com fármaco incorporado, a mais resistente mecanicamente foi a formulação QA 1:1, e a de maior opacidade foi a de alginato com imiquimode, com valor de 4,27%.

A membrana de QA1:1 apresentou a maior capacidade de absorção de água, com 2,31g/g, enquanto a de alginato apresentou a maior absorção para a solução de saliva simulada, com 10,42 g/g. Já em solução de tampão acetato, a membrana de quitosana foi solubilizada, enquanto a de QA 1:1 com fármaco absorveu 57,19 g/g. A solução salina tamponada solubilizou todas as formulações que possuíam alginato.

A liberação do imiquimode das membranas em solução de saliva simulada apresentou um mecanismo do tipo *quasi*-Fickiano, em que a difusão ocorre parcialmente pela matriz e parcialmente pelos poros intumescidos da mesma, com influência do intumescimento para as formulações de quitosana e QA 1:1. Já em solução salina tamponada, a membrana de quitosana e a de QA 1:1 tiveram seu mecanismo de liberação controlado pelo intumescimento da matriz em conjunção com a difusão Fickiana, enquanto as formulações de alginato e QA 1:3 apresentaram o comportamento denominado Supercaso II, no qual é possível observar mecanismos de transporte decorrentes do estresse mecânico sofrido pela matriz polimérica causado pelo intumescimento, desenovelamento de cadeia poliméricas e subsequente erosão.

Os ensaios de TGA permitiram concluir que a adição do fármaco na formulação

resulta em interações deste com os polímeros formadores da matriz, alterando os eventos térmicos presentes nestas formulações.

As formulações não apresentaram diferença estatística significativa a 95% de confiança quanto à propriedade de mucoadesividade, mostrando que adição do fármaco não alterou esta propriedade dos polímeros.

Os ensaios biológicos permitiram avaliar a ação da droga diretamente na viabilidade celular. Embora não se tenha verificado morte das células oriundas das linhagens FaDu e HN13 em decorrência da ação direta da droga, as da linhagem 4T1 sofreram grande variação em sua viabilidade. O ensaio de *western blot* possibilitou a confirmação prevalente da literatura que esta droga atua na modulação de proteínas complexas resultando em uma resposta imune que leva à indução de morte tumoral, possibilitando sua utilização no tratamento de carcinoma de células escamosas. O teste de viabilidade direto mostrou que a formulação de QA 1:1 foi a que mais alterou a viabilidade celular, enquanto o teste indireto mostrou que a membrana de quitosana é a que apresenta o efeito mais desejável, de modo que as formulações têm de fato potencial para o tratamento desta neoplasia, mas não necessariamente se pode explicitar qual seria a formulação mais atrativa.

Assim, o sistema proposto pode ser viável para os locais de aplicação propostos, visto que este apresentou resistência mecânica e estabilidade à temperatura adequados, e embora a liberação tenha sido inferior ao que se encontra em materiais disponíveis comercialmente na forma de creme, a quantidade liberada mostrou-se adequada considerando as interações do fármaco hidrofóbico com a pele e sua elevada permeabilidade a compostos lipofílicos, em especial a membrana de QA 1:3, com liberação de imiquimode de 18,91 µg/mL, os quais apresentaram-se dentro da faixa de concentração de fármaco, de 5 a 20 µg/mL, que reduziram a viabilidade celular das linhagens tumorais utilizadas nos ensaios biológicos dentro da faixa de tempo pré-estipulada correspondente ao período de sono do paciente, de aproximadamente 8 horas.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Para a continuidade deste trabalho, sugere-se:

- a) Avaliação da incorporação do imiquimode nas membranas a partir da dissolução prévia do fármaco em solvente adequado, como o ácido acético concentrado, e a adição deste ao PEC.
- b) Exploração de técnicas de micronização do imiquimode, com vistas a melhorar sua

distribuição na matriz polissacarídica e a aumentar sua disponibilidade para solubilização em meios fisiológicos.

- c) Avaliação da solubilidade de imiquimode em solução de quitosana ácida e o quanto esta é capaz de influenciar o processo de complexação com alginato ou outros polieletrólitos.
- d) Realização de ensaios *in vitro* de permeação de liberação do fármaco em mucosas, particularmente na mucosa oral de porcos, que consistem em ensaios de referência para o tipo de aplicação almejada.
- e) Estudo do comportamento da mucosa bucal frente ao contato com o imiquimode livre, levantando-se dados de potenciais efeitos colaterais.
- f) Estudo de mucoadesão das membranas em diversos tipos de mucosas bucais, desde palato duro a bochecha, de modo a refinar o potencial de aplicação do sistema.
- g) Comparação dos resultados dos ensaios de mucoadesividade com dados obtidos com padrões de material mucoadesivo e não mucoadesivo.
- h) Estudo de tempo de retenção e integridade da amostra quando aderida ao tecido de mucosa alvo quando sob influência de sucessivas lavagens com solução de saliva.
- i) Realização de ensaios *in vivo* em animais para analisar a eficiência do imiquimode em tumores de CCE, e caso os dados sejam promissores, a realização de testes clínicos em humanos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUZZO, A.; BIGUCCI, F.; CERCHIARA, T.; CRUCIANI, F.; VITALI, B.; LUPPI, B. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 581–588, 2012.

ABRUZZO, A.; BIGUCCI, F.; CERCHIARA, T.; SALADINI, B.; GALLUCCI, M. C.; CRUCIANI, F.; VITALI, B.; LUPPI, B. Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 651–658, 2013.

AGÜERO, L.; ZALDIVAR-SILVA, D.; PEÑA, L.; DIAS, M. L. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 32–43, 2017.

AHN, M.-Y.; KWON, S.-M.; CHEONG, H. H.; PARK, J.-H.; LEE, J.; MIN, S.-K.; AHN, S.-G.; YOON, J.-H. Toll-like receptor 7 agonist, Imiquimod, inhibits oral squamous carcinoma cells through apoptosis and necrosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, p. 540–546, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2017. p. 1–71, 2017.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D882: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **ASTM International**, p. 12, 2012.

ANBINDER, P. S.; DELADINO, L.; NAVARRO, A. S.; AMALVY, J. I.; MARTINO, M. N. Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 1, p. 80–87, 2011.

BELLINI, M. Z.; PIRES, A. L. R.; VASCONCELOS, M. O.; MORAES, Â. M. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. S2, p. E421–E431, 2012.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.

BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Tuning the properties of alginate-chitosan membranes by varying the viscosity and the proportions of polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 46, p. 1–11, 2016.

BODDUPALLI, B.; MOHAMMED, Z.; NATH, R.; BANJI, D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 1, n. 4, p. 381–387, 2010.

BOMBALDI DE SOUZA, R. F.; BOMBALDI DE SOUZA, F. C.; MORAES, Â. M. Analysis of the performance of polysaccharide membranes in aqueous media as a tool to assist wound-dressing selection. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 40, p. 45386, 2017.

BRAGA, M. E. M.; PATO, M. T. V.; SILVA, H. S. R. C.; FERREIRA, E. I.; GIL, M. H.; DUARTE, C. M. M.; SOUSA, H. C. DE. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivatives. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, n. 2, p. 245–257, 2008.

BRENER, S.; JEUNON, F. A.; BARBOSA, A. A.; GRANDINETTI, H. DE A. M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63–69, 2007.

BUENO, C. Z.; DIAS, A. M. A.; SOUSA, H. J. C. DE; BRAGA, M. E. M.; MORAES, Â. M. Control of the properties of porous chitosan-alginate membranes through the addition of different proportions of Pluronic F68. **Materials Science and Engineering C**, v. 44, p. 117–125, 2014.

BUENO, C. Z.; MORAES, Â. M. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 122, n. 1, p. 624–631, 2011.

CAETANO, G. F.; FRADE, M. A. C.; ANDRADE, T. A. M.; LEITE, M. N.; BUENO, C. Z.; MORAES, Â. M.; RIBEIRO-PAES, J. T. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 103, n. 5, p. 1013–1022, 2015.

CAMARGO, L. G. “Prospecção de um fármaco e análise de metodologias de sua incorporação em uma membrana de quitosana e alginato para aplicação como dispositivo de liberação controlada em lesões associadas a tumores de pele”. Trabalho de Conclusão de

Curso, Faculdade de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. 1. ed. São Paulo: Artliber, 2007.

CARAMELLA, C. M.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERONI, M. C.; SANDRI, G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 92, p. 39–52, 2015.

CARDOSO DA COSTA, P. J.; COSTA, P. J. C. Avaliação *in vitro* da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, 2002.

CHOLLET, J. L.; JOZWIAKOWSKI, M. J.; PHARES, K. R.; REITER, M. J.; RODDY, P. J.; SCHULTZ, H. J.; TA, Q. V.; TOMAI, M. A. Development of a topically active imiquimod formulation. **Pharmaceutical development and technology**, v. 4, n. 1, p. 35–43, 1999.

CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2806–2814, 2008.

CORSON, S. L. Clinical experience with System, a new transdermal form of hormone replacement therapy. **International journal of fertility and menopausal studies**, v. 38 Suppl 1, p. 36–44, 1993.

CUBAYACHI, C.; COUTO, R. O. DO; GAITANI, C. M. DE; PEDRAZZI, V.; FREITAS, O. DE; LOPEZ, R. F. V. 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.

CZARNECKI, D.; STAPLES, M.; MAR, A.; GILES, G.; MEEHAN, C. Metastases from Squamous Cell Carcinoma of the Skin in Southern Australia. **Dermatology**, v. 189, n. 1, p. 52–54, 1994.

DENORA, N.; LOPEDOTA, A.; PERRONE, M.; LAQUINTANA, V.; IACOBAZZI, R. M.; MILELLA, A.; FANIZZA, E.; DEPALO, N.; CUTRIGNELLI, A.; LOPALCO, A.; FRANCO, M. Spray-dried mucoadhesives for intravesical drug delivery using N-acetylcysteine- and glutathione-glycol chitosan conjugates. **Acta Biomaterialia**, v. 43, p. 170–184, 2016.

DESAI, K. G. H.; MALLERY, S. R.; HOLPUCH, A. S.; SCHWENDEMAN, S. P. Development and *in vitro-in vivo* evaluation of fenretinide-loaded oral mucoadhesive patches for site-specific chemoprevention of oral cancer. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 10, p. 2599–2609, 2011.

DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; ZAWISLAK, A. A.; DAVID WOOLFSON, A. Design and physicochemical characterisation of a bioadhesive patch for dose-controlled topical delivery of imiquimod. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 2, p. 318–325, 2006.

FERFERA-HARRAR, H.; AIOUAZ, N.; DAIRI, N.; HADJ-HAMOU, A. S. Preparation of chitosan-g-poly(acrylamide)/montmorillonite superabsorbent polymer composites: Studies on swelling, thermal, and antibacterial properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 1, p. 1-14, 2014.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1–14, 2006.

GIRATA, A. K. “Desenvolvimento de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata”. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GIUNCHEDI, P.; JULIANO, C.; GAVINI, E.; COSSU, M.; SORRENTI, M. Formulation and *in vivo* evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, n. 2, p. 233–239, 2002.

GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 1–12, 2012.

GOKTAS, S.; DMYTRYK, J. J.; MCFETRIDGE, P. S. Biomechanical Behavior of Oral Soft Tissues. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 8, p. 1178–1186, 2011.

GRASSI, M.; GRASSI, G. Mathematical Modelling and Controlled Drug Delivery: Matrix Systems. **Current Drug Delivery**, v. 2, n. 1, p. 97–116, 2005.

GREEN, A. C.; OLSEN, C. M. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review. **British Journal of Dermatology**, p. 1–9, 2017.

HAUGSTAD, K. E.; HÅTI, A. G.; NORDGÅRD, C. T.; ADL, P. S.; MAURSTAD, G.; SLETMOEN, M.; DRAGET, K. I.; DIAS, R. S.; STOKKE, B. T. Direct determination of chitosan-mucin interactions using a single-molecule strategy: Comparison to alginate-mucin interactions. **Polymers**, v. 7, n. 2, p. 161–185, 2015.

HAWROT, A.; ALAM, M.; RATNER, D. Squamous cell carcinoma. **Current Problems in Dermatology**, v. 15, n. 3, p. 91–133, 2003.

HUNTER ASSOCIATES LABORATORY. **ColorQuest® XE User's Manual**, Hunter Associates Laboratory, 2008. Disponível em: <<https://www.hunterlab.com/colorquest-xe-user-manual.pdf?r=false>>. Acesso em: 3 de abril. 2017

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**.

JIMÉNEZ-BARANDA, S.; SILVA, I. P.; BHARDWAJ, N. Plasmacytoid dendritic cells lead the charge against tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 2, p. 481–484, 2012.

JIMENEZ-SANCHEZ, G.; PAVOT, V.; CHANE-HAONG, C.; HANDKÉ, N.; TERRAT, C.; GIGMES, D.; TRIMAILLE, T.; VERRIER, B. Preparation and *In Vitro* Evaluation of Imiquimod Loaded Polylactide-based Micelles as Potential Vaccine Adjuvants. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 1, p. 311–320, 2015.

KESAVAN, K.; NATH, G.; PANDIT, J. K. Sodium alginate based mucoadhesive system for gatifloxacin and its *in vitro* antibacterial activity. **Scientia pharmaceutica**, v. 78, n. 4, p. 941–57, 2010.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339–2349, 2003.

KULKARNI, A. D.; BARI, D. B.; SURANA, S. J.; PARDESHI, C. V. *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* performance of chitosan-based spray-dried nasal mucoadhesive microspheres of diltiazem hydrochloride. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 108–117, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between Alginate and Chitosan

Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2533–2541, 2007.

LEE, J. W.; KIM, S. Y.; KIM, S. S.; LEE, Y. M.; LEE, K. H.; KIM, S. J. Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 73, n. 1, p. 113–120, 1999.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9–22, 2011.

LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MA, X. Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 1, p. 1–6, 2009.

LOGITHKUMAR, R.; KESHAVNARAYAN, A.; DHIVYA, S.; CHAWLA, A.; SARAVANAN, S.; SELVAMURUGAN, N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 172–188, 2016.

LUO, K.; YIN, J.; KHUTORYANSKAYA, O. V.; KHUTORYANSKIY, V. V. Mucoadhesive and elastic films based on blends of chitosan and hydroxyethylcellulose. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 2, p. 184–192, 2008.

MA, L.; GAO, C.; MAO, Z.; ZHOU, J.; SHEN, J.; HU, X.; HAN, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 26, p. 4833–41, 2003.

MALLEPALLY, R. R.; BERNARD, I.; MARIN, M. A.; WARD, K. R.; MCHUGH, M. A. Superabsorbent alginate aerogels. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 79, p. 202–208, 2013.

MARINKOVICH, M. P. Tumour microenvironment: Laminin 332 in squamous-cell carcinoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 5, p. 370–380, 2007.

MEDICIS PHARMACEUTICAL CORP. **Aldara - FDA prescribing information, side effects and uses**. Disponível em: <<https://www.drugs.com/pro/aldara.html#S2>>. Acesso em: 29 de junho. 2017.

MENG, X.; TIAN, F.; YANG, J.; HE, C. N.; XING, N.; LI, F. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1751–1759, 2010.

MICALI, G.; LACARRUBBA, F.; NASCA, M. R.; SCHWARTZ, R. A. Topical pharmacotherapy for skin cancer: Part I. Pharmacology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 6, p. 965.e1-965.e12, 2014.

MILLER, D. L.; WEINSTOCK, M. A. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 30, n. 5 Pt 1, p. 774–8, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. DE A. À S. **Portaria No 516, de 17 de junho de 2015**. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2015/prt0516_17_06_2015.html>. Acesso em: 28 de junho. 2017.

MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 187–199, 2011.

MÜLLER, C.; MA, B. N.; GUST, R.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiopyrazole preactivated chitosan: Combining mucoadhesion and drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 5, p. 6585–6593, 2013.

NETO, C. G. T.; GIACOMETTI, J. A.; JOB, A. E.; FERREIRA, F. C.; FONSECA, J. L. C.; PEREIRA, M. R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 2, p. 97–103, 2005.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

ORAL CANCER FOUNDATION. **Oral Cancer Facts**. Disponível em: <<http://oralcancerfoundation.org/facts/>>. Acesso em: 24 de maio, 2017.

PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and *in vitro* release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1–2, p. 34–42, 2006.

PATEL, T. N.; PATEL, M. M. Preparation and Evaluation of Imiquimod Loaded Liposomal Dispersion: Part-I. **Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 56–62, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2015.

PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110–1, 1985.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169–172, 1989.

PIRES, A. L. R. “Desenvolvimento de curativos flexíveis e neutralizados de quitosana e alginato contendo alphasan[®] Rc2000”. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

PIRES, A. L. R. “Desenvolvimento de dispositivos flexíveis densos e porosos visando a liberação controlada de compostos bioativos extraídos de plantas para potencial aplicação em lesões de pele”. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

PIRES, A. L. R.; MORAES, Â. M. Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the addition of a biocompatible silicone rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 12, p. 1–9, 2015.

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 17–21, 2002.

PUBCHEM. **Imiquimod**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/imiquimod#section=Chemical-and-Physical-Properties>>. Acesso em: 15 de maio, 2017.

RAMINENI, S. K. “Mucoadhesive films for treatment of local oral disorders: development, characterization and *in vivo* testing”. Tese de doutorado, Universidade do Kentucky, Lexington, 2014.

RAMINENI, S. K.; CUNNINGHAM, L. L.; DZIUBLA, T. D.; PULEO, D. A. Development of imiquimod-loaded mucoadhesive films for oral dysplasia. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 2, p. 593–603, 2013a.

RAMINENI, S. K.; CUNNINGHAM, L. L.; DZIUBLA, T. D.; PULEO, D. A. Competing properties of mucoadhesive films designed for localized delivery of imiquimod. **Biomaterials Science**, v. 1, n. 7, p. 753, 2013b.

RAMINENI, S. K.; DZIUBLA, T. D.; CUNNINGHAM, L. L.; PULEO, D. A. Local delivery of imiquimod in hamsters using mucoadhesive films and their residence time in human patients. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 118, n. 6, p. 665–673, 2014.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23–36, 1987a.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1987b.

RODRIGUES, A. P.; SANCHEZ, E. M. S.; COSTA, A. C. DA; MORAES, A. M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, n. 4, p. 2703–2710, 2008.

SABITHA, P.; VIJAYA RATNA, J.; RAVINDRA REDDY, K. Design and evaluation of controlled release chitosan-calcium alginate microcapsules of anti-tubercular drugs for oral use. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 1, p. 88–98, 2010.

SALAMAT-MILLER, N.; 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.

SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M.; SUTARIYA, V. B. Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 2, p. 215–232, 2007.

SANKAR, V.; HEARNDEN, V.; HULL, K.; JURAS, D. V.; GREENBERG, M.; KERR, A.; LOCKHART, P.; PATTON, L.; PORTER, S.; THORNHILL, M. Local drug delivery for oral mucosal diseases: Challenges and opportunities. **Oral Diseases**, v. 17, n. SUPPL. 1, p. 73–84, 2011.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 1–7, 2006.

SAVAGE, P.; HORTON, V.; MOORE, J.; OWENS, M.; WITT, P.; GORE, M. E. A phase I clinical trial of imiquimod, an oral interferon inducer, administered daily. **British journal of cancer**, v. 74, n. 9, p. 1482–6, 1996.

SHIN-YA, Y.; TSURUSHIMA, H.; TSURUMI, T.; KAJIUCHI, T.; LEONG, K. W. Polyelectrolyte Complex Films Derived from Polyethyleneoxide-Maleic Acid Copolymer and Chitosan: Preparation and Characterization. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 5, p. 526–531, 2004.

SIDDARAMAIAH, T. M. M.; SWAMY, T. M. M.; RAMARAJ, B.; LEE, J. H. Sodium alginate and its blends with starch: Thermal and morphological properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, n. 6, p. 4075–4081, 2008.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 328–343, 2008.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 351–362, 2012.

SIGMA-ALDRICH. **Imiquimod**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i5159?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 2 de maio, 2017.

SILVA, J. M.; GARCÍA, J. R.; REIS, R. L.; GARCÍA, A. J.; MANO, J. F. Tuning cell adhesive properties via layer-by-layer assembly of chitosan and alginate. **Acta Biomaterialia**, v. 51, p. 279–293, 2017.

SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O.; ØSTGAARD, K.; HEMMER, P. C. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in biotechnology*, v. 8, n. 3, p. 71–8, 1990.

SOUZA, R. F. B.; SOUZA, F. C. B.; MORAES, Â. M. Polysaccharide-based membranes loaded with erythromycin for application as wound dressings. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 22, p. 1-15, 2016.

TEXTURE TECHNOLOGIES CORP.; STABLE MICRO SYSTEMS. **Probes & Fixtures** | **Texture Technologies**. Disponível em:

<<http://texturetechnologies.com/accessories/probes-and-fixtures>>. Acesso em: 15 de julho 2017.

THIE, N. M. R.; KATO, T.; BADER, G.; MONTPLAISIR, J. Y.; LAVIGNE, G. J. The significance of saliva during sleep and the relevance of oromotor movements. **Sleep Medicine Reviews**, v. 6, n. 3, p. 213–227, 2002.

VEIGA, I. G. “Produção e caracterização de membranas de quitosana associada com outros biopolímeros para liberação controlada de anti-inflamatórios”. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

VEIGA, I. G.; MORAES, Â. M. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. S1, p. E154–E160, 2012.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

WAN, F.; LENARDO, M. J. Specification of DNA binding activity of NF-kappaB proteins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 4, p. 1-16, 2009.

WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L.-Y. Chitosan–alginate–CaCl₂ system for membrane coat application. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 8, p. 1134–1142, 2001.

WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A.; LIM, L. Y. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, n. 5, p. 610–618, 2002.

WHITE, S. A.; LATIMER. “Nutrition and plant growth regulator rates for high quality growth of containerized spiderwort (*Tradescantia virginiana* L.)”. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual e Instituto Politécnico da Virgínia, Blacksburg, 2003.

XU, J.; STRANDMAN, S.; ZHU, J. X. X.; BARRALET, J.; CERRUTI, M. Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. **Biomaterials**, v. 37, p. 395–404, 2015.

YAN, X.; KHOR, E.; LIM, L. Y. PEC films prepared from Chitosan-Alginate coacervates. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 48, n. 7, p. 941–946, 2000.

ZHAO, B.; RONG, Y.-Z.; HUANG, X.-H.; SHEN, J.-S. Experimental and theoretical study on the structure and electronic spectra of imiquimod and its synthetic intermediates. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, p. 4942–4946, 2007.