



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Edna da Silva Vieira

**Desenvolvimento de nanoemulsões revestidas com ácido hialurônico contendo  
curcumina e melatonina visando aplicação local no câncer de boca**

Florianópolis

2022

Edna da Silva Vieira

**Desenvolvimento de nanoemulsões revestidas com ácido hialurônico contendo curcumina e melatonina visando aplicação local no câncer de boca**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna, Dr<sup>a</sup>.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vieira, Edna da Silva

Desenvolvimento de nanoemulsões revestidas com ácido hialurônico contendo curcumina e melatonina visando aplicação local no câncer de boca / Edna da Silva Vieira ; orientadora, Elenara Maria Teixeira Lemos Senna, 2022. 199 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Câncer de boca. 3. Curcumina. 4. Melatonina. 5. Nanoemulsões revestidas com ácido hialurônico. I. Lemos Senna, Elenara Maria Teixeira . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Edna da Silva Vieira

**Desenvolvimento de nanoemulsões revestidas com ácido hialurônico contendo curcumina e melatonina visando aplicação local no câncer de boca**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Marcos Antonio Segatto Silva, Dr  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Elena Riet Correa Rivero, Dr.(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marlus Chorilli, Dr.  
Universidade Estadual Paulista

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Elenara Maria Teixeira Lemos-Senna, Dr.(a)  
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado a todos os amigos que fiz nessa caminhada, aos meus pais e todos os professores que já passaram na minha vida

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente à minha orientadora Profa. Dra. Elenara Lemos-Senna que me acolheu e com muita paciência me guiou pelo caminho necessário para concluir esse trabalho. Estendo a mesma gratidão aos colegas que contribuíram para realização e interpretação de experimentos: Carine Zuglianello, Mariana Battisti, Daiane Andressa, Bibiana Matte, Luiza Brand, Leonardo Diel, Eduarda Mohr e Daiane Bobermin. Assim como aos professores que contribuíram com o sucesso desse trabalho Prof. Marcelo Lamers (UFRGS), Prof. Jamil Assreuy (UFSC) e Prof. Eduardo Dalmarco. E aos laboratórios da UFSC que me prestaram suporte assim como os técnicos presentes no LAMEB, CEBIME, LCME e LINDEN. Ao financiamento e apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Por fim, finalizo agradecendo à família e amigos que torceram por mim, mesmo de longe e as amizades conquistadas durante os anos de trabalho no Laboratório de Farmacotécnica da UFSC. A contribuição de todos que foram citados permitiu a realização desse sonho que me trouxe muito mais que um título.

## RESUMO

A curcumina (CUR) e a melatonina (MEL) são compostos naturais que exibem atividade antitumoral em carcinoma espinocelular (CEC) oral. Apesar das vantagens associadas ao tratamento local do câncer de boca, a administração de fármacos na cavidade oral é desafiadora, já que é preciso superar os efeitos mecânicos e fluxo salivar que podem remover rapidamente a forma farmacêutica da mucosa. As nanoemulsões são sistemas de administração de fármacos potenciais para liberação de fármacos na cavidade oral, permitem a entrega de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma formulação. Além disso, podem ter sua superfície modificada pela introdução de diferentes ligantes que podem direcionar a nanoemulsão à receptores alvo específicos de células tumorais. Dessa forma, esse estudo teve o objetivo de desenvolver nanoemulsões inicialmente catiônicas compostas por CUR e MEL (NE<sub>CUR/MEL</sub>) como uma nova abordagem para o tratamento adjuvante do CEC. Para promover o direcionamento específico ao receptor CD44 superexpresso no câncer de boca as nanoemulsões foram combinadas com ácido hialurônico (HA) para obter nanoemulsões revestidas com HA carregadas com CUR e MEL (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>). As nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho, potencial zeta, teor e perfil de liberação de fármacos, assim como foi demonstrada sua capacidade mucoadesiva. As formulações obtidas apresentaram tamanho nanométrico e com baixa dispersão de tamanho, seu teor foi cerca de 85 µg/mL de CUR e 490 µg/mL de MEL. A capacidade mucoadesiva das nanoemulsões foi evidenciada pela forte capacidade de interagir com a mucina, demonstrando a superioridade das formulações revestidas com HA. Estudos de citotoxicidade *in vitro* foram realizados com as linhagens HACAT, CAL27 e SCC9 pelas técnicas de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e SRB (Sulforodamina B). Esse estudo demonstrou que as nanoemulsões resultaram em menores viabilidades celulares quando comparadas aos fármacos livres, demonstrando morte celular induzida por apoptose. A influência positiva da associação de CUR/MEL e revestimento só pode ser observado pela técnica de MTT. A internalização celular de CUR a partir das nanoemulsões foi superior ao fármaco livre, mas não demonstrou diferença significativa em função do revestimento. Esferoides multicelulares com as mesmas linhagens foram obtidos e tratados com HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> e CUR/MEL por até 72 h. Nesse caso as nanoemulsões mesmo em baixas concentrações foram capazes de alterar a integridade das esferas de CAL27 e SCC9, preservando HACAT. A polaridade celular avaliada após 24 h de tratamento com HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> e CUR/MEL demonstrou a capacidade da nanoemulsão em reduzir a polarização, principalmente quando consideramos a SCC9. Esses achados sugerem que HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> podem ser considerados como uma abordagem promissora no tratamento coadjuvante do câncer oral.

**Palavras-chave:** Câncer de boca; nanoemulsão; curcumina; melatonina; ácido hialurônico; mucoadesão.

## ABSTRACT

Curcumin (CUR) and melatonin (MEL) are natural compounds that have exhibited anticancer effects against oral squamous cell carcinoma (OSCC). However, despite the advantages of the local treatment of oral cancer, the delivery of drugs in the oral cavity may be challenging since drugs need to overcome the mechanical effects of the salivary washout that can quickly remove the dosage form from oral mucosa. Nanoemulsions have emerged as potential carriers for drug release in the oral cavity, allowing the delivery of both hydrophilic and hydrophobic drugs in the same formulation. Besides, nanoemulsions may have their surface modified by introducing different types of ligands to target receptors expressed on the surface of the cells. Considering that, in this study, we describe the development of cationic nanoemulsions co-delivering CUR and MEL (NE<sub>CUR/MEL</sub>) as a new approach for adjuvant treatment of OSCC. Aiming to target the cluster-determinant 44 (CD44) receptor, which is overexpressed in the OSCC, the nanoemulsions were coated with hyaluronic acid (HA) to generate CUR/MEL-loaded HA-coated nanoemulsions (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>). The nanoemulsions were prepared and characterized according to size, zeta potential, drug loading, accelerated stability, release profiles and mucoadhesive properties. The nanoemulsions showed nanometric size and narrow particle size distribution with drug content of 85 µg/mL (CUR) and 490 µg/mL (MEL). The mucoadhesive capacity of nanoemulsions was evidenced by strong ability to interact with mucin. *In vitro* cytotoxicity studies were carried out on the HACAT, CAL27 and SCC9 cell lines by using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) and SRB (Sulforhodamine B) method. These studies demonstrated that nanoemulsions significantly decreased the viability of tumor cell lines by inducing apoptosis. The positive influence of CUR/MEL association and HA-coating was observed by the MTT technique only. Cellular uptake of CUR from nanoemulsions was greater than free CUR, but it did not show significant difference between nanoemulsions. Multicellular spheroids (HACAT, CAL27 and SCC9) treated with HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> and CUR/MEL for 72 h showed reduction sphere integrity of CAL29 e SCC9, of CAL27 and SCC9 spheres, preserving HACAT. Cell polarity evaluated after 24 h of treatment with HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> and CUR/MEL demonstrated the ability of nanoemulsion to reduce polarization, especially on SCC9. These findings suggest that HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> may be considered a promising approach for the coadjuvant treatment of oral cancer.

**Keywords:** Curcumin, melatonin, oral cancer, mucoadhesion, nanoemulsions, hyaluronic acid.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1.</b> Câncer de boca afetando a) assoalho da boca b) borda lateral da língua.....	35
<b>Figura 2.</b> Estrutura química e porcentagem dos curcuminóides encontrados na Curcuma longa L. A) Curcumina B) Dimetoxicurcumina C) Bisdemetoxicurcumina.....	38
<b>Figura 3.</b> Tautomerismo ceto-enólico da curcumina.....	39
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de ação descritos para a curcumina no CEC.....	43
<b>Figura 5.</b> Estrutura química da melatonina.....	45
<b>Figura 6.</b> Funções fisiológicas moduladas pela melatonina. ....	46
<b>Figura 7.</b> Mecanismos oncostáticos propostos para a melatonina sobre o câncer espinocelular de cabeça e pescoço.....	47
<b>Figura 8.</b> Mecanismo passivo de aumento da retenção e permeabilidade vascular em tumores (EPR). ....	51
<b>Figura 9.</b> Estrutura química do ácido hialurônico. ....	53
<b>Figura 10.</b> Esquema de vetorização ativa promovida pelo revestimento do nanocarreador com ácido hialurônico e sua internalização mediada pelos receptores CD44. ....	55
<b>Figura 11.</b> Nanoemulsão óleo em água (o/a).....	56
<b>Figura 12.</b> Processo de emulsificação espontânea na obtenção de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A). ....	60
<b>Figura 13.</b> Representação esquemáticas das diferentes rotas de desestabilização das nanoemulsões. ....	61
<b>Figura 14.</b> Esquema de obtenção de uma nanoemulsão revestida com ácido hialurônico por meio de interações eletrostáticas. ....	63
<b>Figura 15.</b> Regiões da cavidade oral utilizadas para administração bucal de fármacos (a) e representação da estrutura da mucosa bucal (b). ....	65
<b>Figura 16.</b> Representação da estrutura da glicoproteína mucina e seus domínios para possíveis interações. ....	66
<b>Figura 17.</b> Etapas do processo de mucoadesão. ....	67

## CAPÍTULO I

<b>Figure 1. 1.</b> Chemical structure of (a) curcumin and (b) melatonin. ....	95
<b>Figure 1. 2.</b> Representative chromatographic profiles obtained for (a) CUR-MEL-loaded HA-acid coated nanoemulsions (b) unloaded HA-coated nanoemulsions. Solid and dotted lines correspond to the chromatograms obtained with detection at 223 and 425 nm, respectively.....	102
<b>Figure 1. 3.</b> Representative calibration curve obtained for (a) curcumin and (b) melatonin after injection of working standard solutions at the concentration range from 0.5 to 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (curcumin) and 1.0 to 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (melatonin). Residual plots obtained for (c) curcumin and (d) melatonin.....	103

## CAPÍTULO II

<b>Figure 2. 1.</b> Effect of the concentration of (a) CTAB and (b) OE on the mean droplet size, PDI, and zeta potential values of unloaded cationic nanoemulsions. (c) and (d) Effect of the molecular weight and concentration of hyaluronic acid on the mean droplet size, PDI, and zeta potential of cationic nanoemulsions prepared with 0.5 mM CTAB. Bars and lines represent mean droplet sizes and zeta potential values, respectively. PDI values are shown inside the bars. Data represent the mean $\pm$ SD (n = 3). ....	128
<b>Figure 2. 2.</b> TEM images of (a) NE <sub>CUR/MEL</sub> and (b) HA-NE <sub>CUR/MEL</sub> . ....	130
<b>Figure 2. 3.</b> Evolution of the light transmission profiles obtained after centrifugation of (a) and (b) NE <sub>CUR/MEL</sub> and (c) and (d) HA-NE <sub>CUR/MEL</sub> C at 4 °C and 25 °C in a LUMI-Sizer® analytical centrifuge. First recorded profiles bottom right, last profiles top right. ....	131
<b>Figure 2. 4.</b> In vitro drug profile obtained for (a) CUR and (b) MEL from NE <sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE <sub>CUR/MEL</sub> in PBS pH 6.5 containing SDS 0.25% (w/v) at 37 $\pm$ 1°C. Data represented as mean $\pm$ SD (n = 3). ....	133
<b>Figure 2. 5.</b> Detachment force (F <sub>max</sub> , bars) and work of adhesion (W <sub>adh</sub> , lines) of uncoated (NE <sub>CUR/MEL</sub> ) and HA-coated nanoemulsions (HA-NE <sub>CUR/MEL</sub> ) obtained by tensile strength method, using a mucin disk as a substrate. Data represented as mean $\pm$ SD. ....	136

**Figure 2. 6.** Cytotoxicity effect of free drugs, unloaded- and drug loaded nanoemulsions on HACAT (a, b, c) and CAL27 (e, d, f) cell lines. Data were expressed as mean  $\pm$  SD, n = 6. (a) and (d) shows the results obtained with the cells treated with CUR alone; (b) and (e) shows the results obtained with the cells treated with the combination of CUR and MEL; and (c) and (f) shows the results of cell viability obtained after treatment of the cell with 35  $\mu$ M of CUR and 345  $\mu$ M of MEL. .... 138

**Figure 2. 7.** Flow cytometric analysis of (a,b) HACAT and (c,d) CAL27 cell apoptosis. Cells were treated with free drugs and drug-loaded nanoemulsions at 35  $\mu$ M of CUR and 345  $\mu$ M of MEL for 24 h. (a) and (c) illustrate the original dot plots of the 7-AAD vers the Annexin-V/FITC fluorescence intensities (logarithmic scales). .... 139

### CAPÍTULO III

**Figura 3. 1.** Resultados obtidos na avaliação da viabilidade celular após 24 horas de tratamento com os fármacos livres e as nanoemulsões em linhagem (a) HACAT, (b) SCC9 e (c) CAL27. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=6)..... 161

**Figura 3. 2.** Resultados obtidos nos estudos de internalização celular após a incubação das células CAL27 com curcumina (CUR) livre e nanoemulsões, na concentração de 1,5  $\mu$ M e 3  $\mu$ M. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=4)..... 162

**Figura 3. 3.** Imagens representativas dos esferoides de HACAT antes e depois de 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com NEB e HA-NEB em concentrações equivalentes a quantidade de CUR (a) 0,03  $\mu$ M (b) 0,3  $\mu$ M (c) 3,5  $\mu$ M (d) 17,5  $\mu$ M and (e) 35,0  $\mu$ M. .... 164

**Figura 3. 4.** Imagens representativas dos esferoides de HACAT, SCC9 e CAL27 antes e depois de 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com CUR/MEL e HA-NECUR/MEL nas concentrações de (a) 0,03  $\mu$ M de CUR e 0,3  $\mu$ M de MEL, (b) 0,3  $\mu$ M de CUR e 3,4  $\mu$ M de MEL e (c) 3,5  $\mu$ M de CUR e 34,5  $\mu$ M de MEL. .... 166

**Figura 3. 5.** Histogramas de distribuição de valores de IP obtidos para a linhagem CAL27 (a) não tratada, (b) tratada com 0,35  $\mu$ M de CUR e 3,45  $\mu$ M de MEL livres, e (c) com a HA-NECUR/MEL, e para a linhagem SCC9 (d) não tratada, (e) tratada com 0,35  $\mu$ M de CUR and 3,45  $\mu$ M de MEL livre (f) com a HA-NECUR/MEL, após 24 h..... 168



## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1.</b> Estudos demonstrando os efeitos da curcumina no câncer de cabeça e pescoço. .....	41
<b>Tabela 2.</b> Estudos envolvendo a utilização de melatonina no câncer de cabeça e pescoço. .....	49

### CAPÍTULO I

<b>Table 1. 1.</b> Results obtained in the evaluation of the system suitability of the HPLC method (n=6). .....	101
<b>Table 1. 2.</b> Analysis of variance (ANOVA) for the linear regression analysis. ....	103
<b>Table 1. 3.</b> Intra-day and inter-day precision for quantification of curcumin (CUR) and melatonin (MEL). .....	104
<b>Table 1. 4.</b> Curcumin (CUR) and melatonin (MEL) recovery values obtained after spiking unloaded nanoemulsions. ....	105
<b>Table 1. 5.</b> Effect of changes in the chromatography conditions on the determination of curcumin (CUR) and melatonin (MEL) both at concentration of 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3). .....	105
<b>Table 1. 6.</b> Physicochemical properties and curcumin (CUR) and melatonin (MEL) loading of uncoated (NE <sub>CUR/MEL</sub> ) and hyaluronic acid-coated nanoemulsions (HA-NE <sub>CUR/MEL</sub> ) (n=3). .....	106

### CAPÍTULO II

<b>Table 2. 1.</b> Physicochemical properties of unloaded and CUR/MEL-loaded nanoemulsions uncoated and coated with HA. Data represented as mean $\pm$ SD (n = 3). .....	129
<b>Table 2. 2.</b> Zeta potential values, droplet sizes, and amount of mucin adsorbed onto NECUR/MEL and HA-NECUR/MEL surface after incubation with a mucin dispersion. Data represented as mean $\pm$ SD (n = 6). .....	135

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 3. 1.</b> Características físico-químicas e de teor e eficiência de encapsulação da curcumina (CUR) e melatonina (MEL) das nanoemulsões. (n = 3).....	158
<b>Tabela 3. 2.</b> Variação na área do esferóide de HACAT expressa como tamanho relativo ao tempo 0 h do respectivo esferóide, após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com NEB e HA-NEB em concentrações equivalentes a quantidade de CUR (a) 0,03 $\mu\text{M}$ (b) 0,3 $\mu\text{M}$ (c) 3,5 $\mu\text{M}$ (d) 17,5 $\mu\text{M}$ e (e) 35,0 $\mu\text{M}$ . Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. ....	165
<b>Tabela 3. 3.</b> Variação na área do esferóide de HACAT, SCC9 e CAL27 expressa como tamanho relativo ao tempo 0 h do respectivo esferóide, após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com CUR/MEL e HA-NECUR/MEL nas concentrações de (a) 0,03 $\mu\text{M}$ de CUR e 0,3 $\mu\text{M}$ de MEL, (b) 0,3 $\mu\text{M}$ de CUR e 3,4 $\mu\text{M}$ de MEL e (c) 3,5 $\mu\text{M}$ de CUR e 34,5 $\mu\text{M}$ de MEL. ....	167

### APÊNDICE A

<b>Tabela A. 1.</b> Composição final das nanoemulsões contendo curcumina e melatonina para a seleção da fase oleosa da formulação. ....	197
<b>Tabela A. 2.</b> Efeito do tipo de óleo vegetal empregado nas nanoemulsões sobre o tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta, recuperação dos fármacos e eficiência de encapsulação.....	197

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

13-HODE	Ácido 13-hidroxiocetadecadienóico
15-LOX-1	Enzima 15-lipoxigenase
5-LOX	Lipoxigenase 5
A/O	Água em óleo
AC	Adenilato ciclase
AH	Ácido hialurônico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AKT	Proteína quinase B
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutico
BSP	Sialoproteína óssea
C/EBP $\alpha$	Proteína estimuladora de ligação alfa
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CAT	Catalase
CD44	Cluster de diferenciação 44
CEC	Carcinoma espinocelular
CECP	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
COX-2	Enzima ciclooxygenase-2
CTAB	Brometo de cetiltrimetil amônio
CTC	Células tronco associadas ao câncer
CUR	Curcumina
CYP450	Citocromo P450
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptores de fator de crescimento epidérmico
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GSR	Glutathione redutase
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano
IGFBP-5	Fator de crescimento semelhante à insulina 5
IKK	Complexo de proteína quinase
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IP	Índice de Polaridade
JNK	C-jun N terminal quinase
LA	Ácido linoleico
LH	Hormônio luteinizante
MEL	Melatonina
MMP	Metaloproteinase de matriz

MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MPP-9	Metaloprotease de matriz 9
MT1	Receptor de membrana acoplados a proteína G
MT2	Receptor de membrana acoplados a proteína G
NC	Nanocarreador
NE	Nanoemulsão
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NP	Nanopartícula
NPC	Nanopartículas catiônicas
O/A	Óleo em água
OA	Oleilamina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAA	Ácido poli (acrílico)
PDI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
PMN	Polimorfonucleares
POX	Peroxidases
PTX	Paclitaxel
QR2	Enzima quinona redutase II
SA	Estearilamina
SOD	Superóxido dismutase
STAT3	Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3
TCC	Triglicerídeos de cadeia curta
TCL	Triglicerídeos de cadeia longa
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ZP	Potencial Zeta



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>33</b>
3.1	CÂNCER DE BOCA.....	35
3.2	CURCUMINA.....	37
3.3	MELATONINA.....	44
3.4	USO DE NANOCARREADORES NO TRATAMENTO DO CÂNCER...50	
<b>3.4.1</b>	<b>Vetorização ativa baseada no receptor CD44 .....</b>	<b>52</b>
3.5	NANOEMULSÕES.....	55
<b>3.5.1</b>	<b>Composição .....</b>	<b>56</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Métodos de preparação e estabilidade.....</b>	<b>58</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Obtenção de nanoemulsões revestidas com ácido hialurônico .....</b>	<b>62</b>
3.6	ADMINISTRAÇÃO BUCAL DE FÁRMACOS.....	64
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
	 <b>CAPÍTULO I – APLICAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE CURCUMINA E MELATONINA EM NANOEMULSÕES REVESTIDAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO.....</b>	 <b>87</b>
	Manuscrito 1 – Application of a new validated HPLC-PDA method for simultaneous determination of curcumin and melatonin in hyaluronic acid-coated nanoemulsions ....	91
	 <b>CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES REVESTIDAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO CONTENDO CURCUMINA E MELATONINA .....</b>	 <b>111</b>

Manuscrito 2: Hyaluronic acid-coated nanoemulsions co-delivering curcumin and melatonin to treat the oral cancer: preparation, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation.....	115
---	-----

<b>CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE DE POLARIDADE E NOS ESFERÓIDES DE LINHAGENS HACAT, SCC9 E CAL27.....</b>	<b>149</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>151</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>153</b>
2.1 MATERIAIS .....	153
2.1.1 Matérias-primas e reagentes.....	153
2.1.2 Cultura de células .....	154
2.2 MÉTODOS.....	154
2.2.1 Preparação das nanoemulsões.....	154
2.2.2 Caracterização das nanoemulsões.....	155
2.2.3 Ensaio de viabilidade celular .....	156
2.2.4 Ensaio de internalização celular .....	156
2.2.5 Ensaio com esferóide multicelular .....	157
2.2.6 Ensaio de polaridade celular .....	157
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>158</b>
3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES .....	158
3.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	159
3.3 ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR.....	162
3.4 ENSAIOS COM ESFERÓIDE MULTICELULAR.....	163
3.5 ENSAIO DE POLARIZAÇÃO CELULAR .....	168
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>169</b>
<b>5 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>171</b>
<b>6 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>181</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>187</b>

<b>APÊNDICE A – SELEÇÃO DO ÓLEO VEGETAL E CONCENTRAÇÃO DOS FÁRMACOS CURCUMINA E MELATONINA PARA AS NANOEMULSÕES</b>	<b>195</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>195</b>
<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>195</b>
<b>Determinação do teor e eficiência de encapsulação dos fármacos .....</b>	<b>196</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>196</b>



## **1 INTRODUÇÃO**

---



O carcinoma de cabeça e pescoço (CCP) é o sexto câncer mais comum em todo o mundo, com 890.000 novos casos e 450.000 mortes em 2018. A incidência de CCP continua crescendo e estimasse que deverá aumentar em 30% (ou seja, 1,08 milhão de novos casos anualmente) até 2030 (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2019; JOHNSON *et al.*, 2020). A exposição a agentes carcinogênicos, incluindo tabaco e álcool, constituem o fator etiológico dominante dessa patologia. No entanto, há estudos que mostram ainda o envolvimento de variações genéticas, bem como infecções por vírus do papiloma humano (HPV) e vírus Epstein-Barr (EBV) no desenvolvimento desse câncer (COHEN; FEDEWA; CHEN, 2018; KAIDAR-PERSON; GIL; BILLAN, 2018; KAREEMAGHAY; TAVASSOLI, 2018).

O CCP se refere a um grupo de cânceres biologicamente similares, que afetam os lábios, cavidade oral, laringe, faringe, seios paranasais e glândulas salivares. Do ponto de vista histológico, cerca de 90% de todos os casos caracterizam-se como carcinoma espinocelular (CEC), sendo que a maioria das lesões ocorrem na cavidade oral, incluindo mucosa bucal, gengiva, palato duro e língua (COLOMBO; RAHAL, 2009; D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018; PAI; WESTRA, 2009; SCUTT *et al.*, 2016). Como são assintomáticos nos estágios iniciais, a detecção do câncer da boca torna-se difícil. Dessa forma, o CEC representa uma significativa preocupação de saúde global, uma vez que os pacientes geralmente apresentam a doença em estágio avançado, o que requer uma terapia multimodal e extensa. O tratamento do CEC com intenção curativa consiste em cirurgia e/ou radioterapia, às vezes combinadas com quimioterapia adjuvante, dependendo do local do tumor, extensão e características histológicas (D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018; LUBEK, 2018; MENDENHALL *et al.*, 2018). A quimioterapia padrão atual é baseada na administração da cisplatina, associada ou não ao cetuximabe. Até recentemente, as opções de tratamento de segunda escolha incluíam o cetuximabe, metotrexato e taxanos, todos associados a efeitos colaterais significativos e baixa taxa de resposta terapêutica, de apenas 10% a 13%. A resistência à múltiplas drogas é a principal razão para a baixa eficácia da quimioterapia antineoplásica. A maioria dos pacientes não responde ao tratamento ou desenvolve resistência adquirida, portanto, é crucial buscar novas estratégias de tratamento que sejam menos agressivas, capazes de aumentar a taxa de sobrevida e melhorar a qualidade de vida do paciente. Neste sentido, torna-se imprescindível a pesquisa por novos alvos terapêuticos e fármacos para aumentar os efeitos citotóxicos dos tratamentos convencionais, sem potencializar os efeitos adversos

(CRUZ; VAISH; DHAR, 2018; KAREEMAGHAY; TAVASSOLI, 2018; SIM; LEIDNER; BELL, 2019).

Compostos bioativos extraídos de diversas fontes naturais têm sido considerados potenciais candidatos no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das neoplasias. Nos últimos anos, a grande maioria dos medicamentos aprovados pelo FDA para tratamento do câncer é constituída por produtos naturais ou compostos sintéticos obtidos com base nos mesmos (BISHAYEE, 2017; KHAZIR *et al.*, 2014). A curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona) é um polifenol derivado da planta *Curcuma longa* L., comumente chamada de açafrão. Muitas pesquisas ao longo dos anos têm atribuído à curcumina atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, antiviral e antibacteriana, como indicado por mais de 6.000 citações encontradas (HU *et al.*, 2015; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014; WILKEN *et al.*, 2011). A curcumina tem se mostrado promissora tanto como um potencial agente quimiopreventivo, quanto no tratamento adjuvante no câncer. Além disso, ensaios clínicos mostraram que a curcumina é bem tolerada após administração oral, apesar da sua limitada absorção (DHILLON *et al.*, 2008).

Outra substância de origem natural que pode ser citada com atividade anticancerígena é a melatonina (N- [2- (5-metoxi-1H-indol-3-il) etil] acetamida). Sua síntese pode ser verificada em bactérias, organismos unicelulares, algas, plantas, invertebrados e em muitos órgãos de vertebrados, principalmente na glândula pineal (AGATHOKLEOUS; KITAO; CALABRESE, 2019; YEH *et al.*, 2017). A melatonina apresenta uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, bem como reguladora do sistema imunológico e do ciclo circadiano (FERNANDEZ-GIL *et al.*, 2019; HARPSOE *et al.*, 2015; SHEN *et al.*, 2018). Estudos avaliando sua ação sobre células cancerígenas demonstraram sua capacidade de induzir espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelulares, as quais quando se acumulam, desempenham papel importante na apoptose e autofagia mediada por mitocôndrias. Em conjunto com alguns fármacos quimioterápicos, a melatonina tem mostrado atividade citotóxica sinérgica. Ainda, a melatonina diferencia as células tumorais das normais, atenuando os efeitos tóxicos dos quimioterápicos e reduzindo a resistência a múltiplos fármacos (FAVERO *et al.*, 2014; NAJAFI *et al.*, 2019; SHEN *et al.*, 2018).



Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* atribuem propriedades oncostáticas para curcumina e melatonina contra carcinoma espinocelular e outros tumores da cavidade oral. Vários mecanismos biológicos são citados, envolvendo principalmente seus efeitos antiproliferativos, moduladores da expressão oncogênica, antioxidantes, anti-inflamatórios, antimetastáticos e antiangiogênicos (ARDITO *et al.*, 2018; CUTANDO *et al.*, 2014; LIU; MADU; LU, 2018; MEHTA; KAUR, 2014; YANG *et al.*, 2017). Muitos estudos em cultura de células têm mostrado o efeito da curcumina no CCP, por meio da inibição da proliferação, redução da viabilidade celular e indução da apoptose. Estudos *in vivo* também evidenciaram resultados promissores do uso da curcumina na redução do crescimento do tumor em modelos de câncer oral (BORGES *et al.*, 2017; WILKEN *et al.*, 2011). Por outro lado, evidências têm mostrado que a associação da melatonina com a curcumina pode favorecer a atividade antitumoral. Como mostrado por Shrestha *et al.* (2017), o tratamento combinado destes dois compostos produziu um efeito sinérgico sobre a inibição do crescimento tumoral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, no câncer de bexiga. Entretanto, a aplicação clínica destes compostos tem sido limitada devido à baixa biodisponibilidade exibida por eles, fato que pode ser explicado pela baixa solubilidade em água, extenso metabolismo de primeira passagem e rápida eliminação sistêmica (DEMURO; NAFZIGER; BLASK, 2000; HARPSOE *et al.*, 2015; MAHMOOD *et al.*, 2015; MAZZARINO *et al.*, 2012; KOMNINOU *et al.*, 2016; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014).

Entre as estratégias que podem ser utilizadas para superar essas limitações está a veiculação em sistemas de liberação de fármacos nanoemulsionados. As nanoemulsões são emulsões cineticamente estáveis com tamanho de gotículas na faixa nanométrica, capazes de melhorar a solubilidade aparente e biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos (HELGESON, 2016; SASIKUMAR; KAMALASANAN, 2017). Adicionalmente, esses nanocarreadores podem se acumular passivamente nos tumores, devido à vasculatura anormal deste tecido. Em decorrência do intenso processo de angiogênese, o endotélio dos vasos que irrigam os tumores apresenta fenestrações que permitem o extravasamento de partículas submicrométricas. Além disso, a ausência de sistema linfático para drenagem resulta em acúmulo das partículas no interior dos tecidos tumorais, ocasionando o efeito denominado EPR (do inglês, *Enhanced Permeation and Retention*) e provocando a maior liberação do fármaco no sítio de ação. Adicionalmente, a superfície dos nanocarreadores pode ser alterada, o que possibilita realizar seu

direcionamento especificamente para as células tumorais, utilizando um mecanismo de ação baseado em moléculas expressas na superfície das células alvo (MARCAZZAN *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2012). A este respeito, o revestimento de nanoemulsões catiônicas com ácido hialurônico, um polissacarídeo natural encontrado na matriz extracelular e fluidos sinoviais do corpo, pode ser empregado como estratégia para direcionar compostos anticancerígenos para células cancerígenas que superexpressam o receptor CD44, como as do câncer de boca. As nanoemulsões catiônicas podem estabelecer interações eletrostáticas com componentes aniônicos, tais como o ácido hialurônico, e serem usadas para veicular fármacos antitumorais para as células cancerosas (CAI *et al.*, 2019; GOTOV *et al.*, 2018; TIWARI; BAHADUR, 2019; WICKENS *et al.*, 2017; ZHONG *et al.*, 2018). Além disso, a modificação das partículas com ácido hialurônico ainda pode atribuir ao sistema propriedades mucoadesivas, característica importante quando se projeta um sistema de liberação de fármacos que necessite de contato prolongado com mucosas (KIM *et al.*, 2019a).

Levando em consideração os aspectos mencionados acima, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanoemulsões catiônicas contendo curcumina e melatonina revestidas com ácido hialurônico, visando a administração bucal no câncer de boca. A administração localizada de fármacos para o tratamento de patologias que afetam a cavidade oral tem sido considerada uma estratégia promissora que permite contornar a limitação terapêutica de fármacos com baixa biodisponibilidade. A mucosa bucal possui baixa atividade enzimática, é altamente vascularizada e apresenta boa permeabilidade. Além do mais, essa via evita o metabolismo de primeira passagem hepático, uma das causas da baixa biodisponibilidade da curcumina e melatonina, assim como de muitas outras substâncias ativas. Nesse sentido, além de interagir com a camada mucosa, prolongando o tempo de contato e aumentando a biodisponibilidade bucal, o uso de nanoemulsões catiônicas revestidas com ácido hialurônico permitiria liberar a curcumina e melatonina diretamente nas células cancerosas aumentando a eficácia terapêutica, sem produzir os efeitos adversos dos agentes antineoplásicos convencionais, melhorando, assim, a qualidade de vida dos pacientes. (ALI *et al.*, 2018; MORALES; BRAYDEN, 2017).

Considerando o exposto, o desenvolvimento de nanoemulsões revestidas com ácido hialurônico para administração bucal de curcumina e melatonina, assim como sua avaliação *in vitro* foram articulados neste trabalho. Para atingir os objetivos propostos,

diferentes etapas foram realizadas e seus resultados foram apresentados na forma de capítulos. O primeiro capítulo contempla o *Manuscrito 1* e descreve o desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação simultânea dos fármacos nas formulações. No segundo capítulo se encontra o *Manuscrito 2* que descreve o desenvolvimento e caracterização das nanoemulsões e atividade citotóxica em uma linhagem tumoral. Por fim, o capítulo 3 refere-se à atividade antitumoral *in vitro* das nanoemulsões e dos fármacos livres, isolados ou em associação em diferentes modelos de cultura de células de câncer de boca. Os resultados obtidos foram analisados e discutidos buscando compreender se a associação dos fármacos curcumina e melatonina em uma mesma formulação e se o emprego de nanoemulsões poderia melhorar a eficácia do tratamento do câncer de boca, podendo servir como uma alternativa complementar às terapias existentes com vistas a melhorar a qualidade de vida desse paciente.



## **2 OBJETIVOS**

---



## 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanoemulsões catiônicas contendo curcumina e melatonina revestidas com ácido hialurônico com vistas ao tratamento local do câncer de boca.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver nanoemulsões catiônicas revestidas ou não com ácido hialurônico contendo curcumina e melatonina pela técnica de emulsificação espontânea, utilizando diferentes lipídios catiônicos e óleos vegetais;
- Desenvolver e validar metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD) para determinação simultânea de curcumina e melatonina nas nanoemulsões;
- Caracterizar as formulações obtidas quanto ao tamanho, distribuição granulométrica, potencial zeta, morfologia, teor e eficiência de encapsulação;
- Obter o perfil de liberação da curcumina e melatonina a partir das nanoemulsões;
- Avaliar a estabilidade e propriedades mucoadesivas das nanoemulsões em modelos *in vitro*;
- Determinar a citotoxicidade e tipo de morte celular das nanoemulsões e dos fármacos livres em linhagem de queratinócitos HACAT e linhagens tumorais de câncer de cabeça e pescoço CAL27 e SCC9;
- Investigar o efeito do revestimento com ácido hialurônico sobre a internalização celular das nanoemulsões;
- Avaliar o índice de polaridade das células após tratamento com as nanoemulsões;
- Analisar visualmente a atividade das nanoemulsões em esferoides celulares das linhagens HACAT, CAL27 e SCC9.







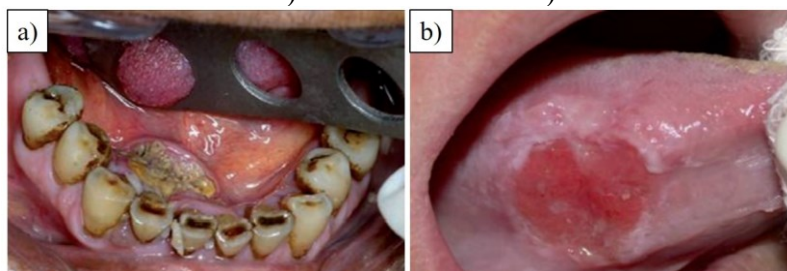


### 3.1 CÂNCER DE BOCA

O câncer é um crescente problema de saúde pública em todo o mundo, os carcinomas de cabeça e pescoço (CCP) estão entre os grupos que apresentam alta incidência, prevalência e mortalidade. Dentro desse grupo, o câncer de boca e orofaringe constituem as neoplasias mais frequentes, sendo responsáveis pelo óbito de mais de 219 mil pessoas em todo mundo, no ano de 2012 (MORO *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2017). O número de casos novos de câncer de boca esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, é de 11.200 casos em homens e de 4.010 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 10,70 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição, e de 3,71 para cada 100 mil mulheres, ocupando a décima terceira posição entre todos os tipos de câncer (INCA, 2019).

O câncer da boca, que inclui o câncer de lábio e câncer intraoral, é um tumor maligno que pode afetar lábios, gengivas, bochechas, céu da boca, língua e sua região inferior, como ilustrado na Figura 1. O carcinoma espinocelular (CEC) representa a forma mais comum de câncer na cavidade intraoral e tem sua origem a partir dos queratinócitos (D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018; ETTINGER, K.; GANRY, L; FERNANDES, 2019; KRÜGER *et al.*, 2013; PARIZI *et al.*, 2010; ZANINI *et al.*, 2004).

Figura 1. Câncer de boca afetando a) assoalho da boca b) borda lateral da língua.



Fonte: Francisco *et al.* (2014).

A boca por se tratar de uma região de fácil acesso para exame, acaba permitindo que profissionais de saúde e até o próprio paciente possam visualizar diretamente alterações suspeitas, podendo levar a um diagnóstico precoce. Entretanto, esse diagnóstico pode ser dificultado uma vez que as lesões iniciais, muitas vezes oligossomáticas, não são valorizadas pelo paciente e profissionais da saúde. Dessa forma, na maioria dos casos ocorre o diagnóstico tardio, em estágios mais avançados da doença, comprometendo o tratamento, o prognóstico e sobrevida dos pacientes. Os CECs orais

apresentam uma alta taxa de cura nos estágios iniciais, cerca de 80%. Já no estágio avançado, a taxa de cura cai para apenas 20% (D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018; LE CAMPION *et al.*, 2016; MORO *et al.*, 2018).

A etiologia do câncer de boca intraoral é multifatorial. Estudos apontam o consumo de tabaco e álcool como os fatores de risco mais significantes. O uso simultâneo dos fatores citados parece apresentar um efeito sinérgico no surgimento do câncer, aumentando de 10 a 20 vezes o risco de seu desenvolvimento. Dessa forma, o CEC parece afetar mais homens do que mulheres, muito provavelmente devido ao estilo de vida masculino que pode incluir uma maior exposição ao tabaco e consumo mais frequente de bebidas alcoólicas (ARAYA, 2018; FELLER; LEMMER, 2012; MONTERO; PATEL, 2015; MORO *et al.*, 2018). Entretanto, o tabagismo e uso de bebidas alcoólicas não podem ser relacionados a todos os casos de CEC. Nos últimos anos, houve um aumento considerável na incidência de casos, em que os pacientes não foram expostos a estes fatores de risco ou, se expostos, foram de forma reduzida. Recentemente, estudos apontam que bolsas periodontais podem servir como reservatórios para o HPV, citomegalovírus e vírus Epstein-Barr, agentes que podem ser associados ao câncer de boca. Além disso, lesões periodontais crônicas podem envolver mediadores inflamatórios, como a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), os quais foram previamente associados à carcinogênese (ANDRADE; SANTOS; OLIVEIRA, 2015; MARCAZZAN *et al.*, 2018; MONTERO; PATEL, 2015; OMAR, 2013).

O tratamento do CEC oral depende do estágio de desenvolvimento do mesmo. Nos estágios iniciais pode ser realizada a ressecção cirúrgica, sempre preferida, dependendo da localização e extensão do tumor. Ela permite a obtenção de informações sobre o tumor por meio da verificação do seu grau de disseminação e das características histopatológicas, auxiliando a avaliar seu risco e determinando o correto manejo do paciente. A radioterapia aparece como uma alternativa à cirurgia, que apesar de apresentar taxas de controle de câncer inferiores, permite a ação em tumores locorregionalmente mais avançados, onde a extensão do mesmo ultrapassa os limites operáveis (ANAYA *et al.*, 2018; CRUZ; VAISH; DHAR, 2018; MONTERO; PATEL, 2015). Estágios mais avançados exigem uma abordagem de tratamento multimodal, utilizando cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A sequência e combinação das terapias depende de cada caso (ANAYA *et al.*, 2018).

Os quimioterápicos mais comumente utilizados na terapia são a cisplatina e 5-fluoruracila, havendo ainda relatos da utilização de carboplatina, paclitaxel, docetaxel e hidroxiureia. Devido à ampla distribuição, o tratamento quimioterápico do CEC pode resultar em diversos efeitos colaterais decorrente da exposição de células saudáveis, além do desenvolvimento de mecanismos de resistência a múltiplas drogas, o que ocasiona uma baixa resposta terapêutica e falha no tratamento em muitos casos. Os mecanismos de resistência no câncer oral ainda não estão totalmente elucidados, mas parecem estar relacionados principalmente à superexpressão de canais de transporte de múltiplas drogas, que são responsáveis pelo efluxo do fármaco da célula tumoral, reduzindo sua quantidade intracelular e diminuindo sua eficácia. Com isso, a utilização de quimioterápicos resulta em uma redução pouco significativa no tamanho do tumor, podendo ocorrer recidiva e resistência ao tratamento (GLENNY *et al.*, 2010; MARCAZZAN *et al.*, 2018; WANG; ZHAO; GOLDMAN, 2003). Assim, para superar os desafios desse tratamento, diferentes estratégias terapêuticas precisam ser combinadas a fim de vencer os mecanismos de resistência nas células tumorais, aumentar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos colaterais (SHI *et al.*, 2019).

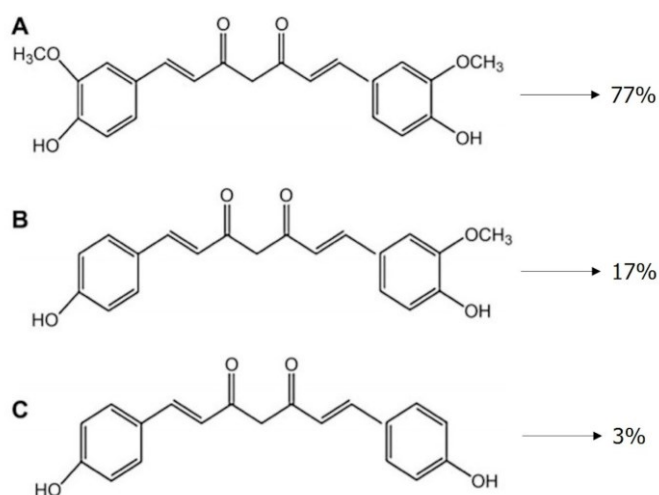
Os produtos naturais configuram um recurso valioso na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos contra o câncer. Nas últimas três décadas, estima-se que cerca de 80% dos medicamentos aprovados pelo FDA para tratamento do câncer são de origem natural ou semissintéticos. A capacidade preventiva e/ou anticâncer desempenhada pelos produtos naturais pode ser explicada por múltiplos mecanismos celulares e moleculares, tais como eliminação de radicais livres, reparo de DNA, alteração no ciclo celular, apoptose, autofagia, atividade anti-inflamatória e antiangiogênica, entre outros (BISHAYEE, 2017; CRAGG; PEZZUTO, 2016; RAJESH *et al.*, 2015). Dentre os compostos naturais, a curcumina e melatonina tem mostrado destacada atividade antitumoral e uma vez sendo os fármacos de escolha deste trabalho, uma revisão mais detalhada é descrita a seguir.

### 3.2 CURCUMINA

O açafrão, conhecido popularmente como açafrão-da-terra ou cúrcuma, é composto por um pó fino e de coloração amarelo alaranjado obtido dos rizomas da *Curcuma longa* L., uma planta nativa no leste asiático. A cúrcuma é uma especiaria

amplamente utilizada e bastante típica na culinária indiana, além de compor parte importante da medicina tradicional indiana e chinesa. Essa planta contém uma classe de compostos polifenóis denominados curcuminóides que compreendem de 3 a 5% do seu rizoma (Figura 2). A curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona) (CUR) (Figura 2A) é o curcuminóide majoritário (77%) presente na cúrcuma, sendo o principal responsável pela coloração amarela e efeitos terapêuticos associados a ela (JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020; KHAN *et al.*, 2018; MARCHI *et al.*, 2016; WILKEN *et al.*, 2011).

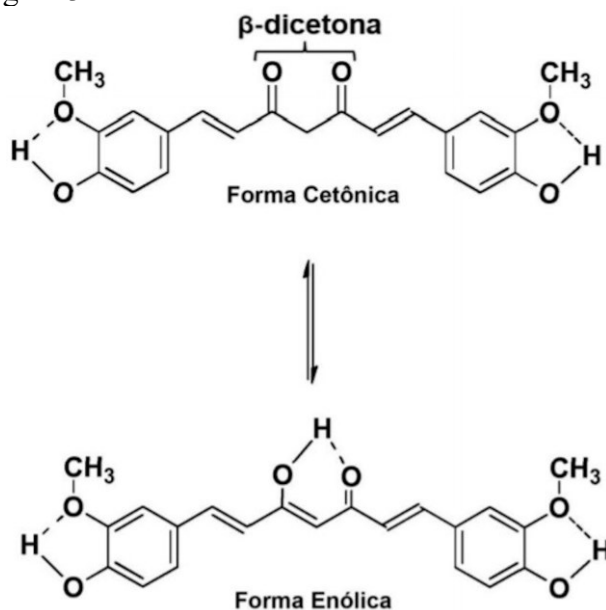
Figura 2. Estrutura química e porcentagem dos curcuminóides encontrados na *Curcuma longa* L. A) Curcumina B) Dimetoxicurcumina C) Bisdemetoxicurcumina.



Fonte: Naksuriya *et al.* (2014).

A CUR apresenta baixo peso molecular (368,37 g/mol) e é composta por dois anéis metoxifenóis ligados simetricamente em conjugação pela porção  $\beta$ -dicetona. Essa porção da molécula permite que a CUR exiba um tautomerismo ceto-enólico (Figura 3) devido à transferência intramolecular do átomo de hidrogênio. A forma enol é mais estável energeticamente na fase sólida e, dependendo do solvente, até 95% pode se apresentar nessa forma (JANKUN *et al.*, 2016; PRIYADARSINI, 2014; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

Figura 3. Tautomerismo ceto-enólico da curcumina.



Fonte: Collino (2014).

Sua molécula apresenta três grupos funcionais reativos, a porção dicetona e dois grupos fenólicos determinam a atividade da CUR. Em condições fisiológicas as formas ceto e enol desempenham papel importante na sua atividade antioxidante eliminando radicais livres por meio de doação e transferência de elétrons de hidrogênio (PRIYADARSINI, 2014; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). A CUR possui três equilíbrios ácido-base em solução:  $pK_{a1}$ : 8,38,  $pK_{a2}$ : 9,88 e  $pK_{a3}$ : 10,51. O  $pK_{a1}$  corresponde ao hidrogênio do grupo enol e o  $pK_{a2}$  e  $pK_{a3}$  são atribuídos aos hidrogênios dos grupos fenólicos (ABOUDIAB; TEHRANI-BAGHA; PATRA, 2020). Suas propriedades químicas ainda dependem da polaridade do solvente, pois se trata de uma molécula hidrofóbica com um  $\text{Log } P$  de 3,2, sendo quimicamente mais estável entre pH 1-6, mas praticamente insolúvel em água nesta faixa de pH (CAS; GHIDONI, 2019; JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020).

Devido as suas características químicas, a CUR tem sido extensivamente estudada ao longo dos anos. Evidências científicas obtidas na última década sugerem que sua molécula seja altamente pleiotrópica, capaz de interagir com um grande número de alvos terapêuticos e mecanismos de ação (FADUS *et al.*, 2017; SIVIERO *et al.*, 2015; SUNAGAWA *et al.*, 2015). Com isso, apresenta potencial ação preventiva e terapêutica contra uma série de doenças. Seus principais efeitos biológicos incluem atividade anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica e citoprotetora. Além disso, vários estudos utilizando técnicas de biotecnologia apontaram

que a CUR é capaz de regular vias de sinalização intracelulares associadas a várias doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, autoimunes, pulmonares, metabólicas, gastrointestinais e psicotrópicas (FADUS *et al.*, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2017; JAMWAL, 2018; KHAN *et al.*, 2018; RAJESH *et al.*, 2015; SUNAGAWA *et al.*, 2015).

Devido a sua excelente atividade antitumoral e antimutagênica, inúmeros estudos demonstram que a CUR pode ser considerada um agente potencial na prevenção e tratamento de diferentes tipos de câncer. A carcinogênese na cavidade oral, estômago, intestino, cólon, pulmão, mama, esôfago e fígado, por exemplo, se mostrou reduzida pela ação da CUR em modelos *in vitro* e *in vivo* (BATRA; PAWAR; BAHL, 2018; KHAN *et al.*, 2018; NAKSURIYA *et al.*, 2014). Estudos demonstrando os efeitos da CUR no CCP são exemplificados na Tabela 1.



Tabela 1. Estudos demonstrando os efeitos da curcumina no câncer de cabeça e pescoço.

Tipo de estudo	Linhagem celular <sup>1</sup> /modelo animal	Tratamento/Dose	Resultados obtidos	Referência
<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	CCL-23; CAL27; SCC1; SCC14 / Camundongo	Até 300 $\mu$ M	↓Viabilidade celular dose dependente ↑Apoptose ↓50% tamanho do tumor	LOTEMPPIO <i>et al.</i> , 2005.
<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	SCC1; SCC9/ Camundongo	IC <sub>50</sub> :15–22 $\mu$ M + radiação	↓COX-2 ↓EGFR	KHAFIF <i>et al.</i> , 2009.
<i>In vitro</i>	SCC25	Até 80 $\mu$ M	↓Proliferação: parada na fase G2/M ↓Invasão: ↓MMP-2 E 9 ↓EGFR, Akt, ERK1/2 e STAT3	ZHEN <i>et al.</i> , 2014.
<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	CAL27; SCC-15; FaDu/ Camundongo	Resveratrol + Curcumina 50 $\mu$ M	↓IC <sub>50</sub> ↑Apoptose ↓NF- $\kappa$ B ↓Tamanho do Tumor	MASUELLI <i>et al.</i> , 2014.
<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	FaDu; Cal27/ Camundongo	Até 10 $\mu$ M/ 200 mg/Kg (oral)	↓NF- $\kappa$ B; ↓Proliferação ↓Migração ↓Angiogênese ↑Caspase 9 e 8 ↑Apoptose	HU <i>et al.</i> , 2015.
<i>In vitro</i>	Cal27 resistente a cisplatina (CAR)	Cetuximabe 20 $\mu$ g/mL + Curcumina 40 $\mu$ M	↓IC <sub>50</sub> ↑Caspase 3 e 9 ↓EGFR ↓ERK, JNK e p38	CHEN <i>et al.</i> , 2018b.
<i>In vitro</i>	PE/CA-PJ15; PE/CA- PJ49; HSC3	Até 50 $\mu$ M	↓Migração ↑ Apoptose ↓Tumorogênese	ARDITO <i>et al.</i> , 2018.
<i>In vitro</i>	Fadu; SCC9	Até 50 $\mu$ M	↑Apoptose ↓Proliferação: parada na fase G2/M Alterações na morfologia Modulação na via de sinalização PI3K e MAPK/AKT/mTOR	BORGES <i>et al.</i> , 2020

<sup>1</sup>Linhagens de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço: CAL27, CCL23, SCC1, SCC9, SCC14, SCC25, SCC15. FaDu: células derivadas de carcinoma epidermóide de lesão primária de hipofaringe. SCC15 e HSC3: Carcinoma epidermóide oral. PE/CA-PJ15e PE/CA-PJ49: carcinoma de células escamosas de língua.

Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Os mecanismos de ação propostos para explicar a atividade da CUR no câncer se baseiam na sua capacidade em modular diversas vias de sinalização celular e afetar

múltiplos alvos moleculares, alterando a atividade de enzimas, receptores de fatores de crescimento, citocinas e genes que regulam a proliferação e apoptose celular (FADUS *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2018). Uma das principais vias descritas reporta a regulação negativa do fator nuclear kappa B (NF-kB), pelo impedimento da sua fosforilação (ZLOTOGORSKI *et al.*, 2013). É sabido que a ativação do fator NF-kB está envolvida no controle e expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória, tendo papel fundamental na promoção de diversos tipos de câncer. Sua ativação se dá por uma ampla gama de agentes, incluindo citocinas inflamatórias, carcinógenos, endotoxinas, assim como pelo estresse extracelular causado pela radiação ultravioleta e fumaça de cigarro, por exemplo, agentes que desempenham papel importante no desenvolvimento do CEC. A ativação do NF-kB tem sido implicada na transformação celular, promoção, angiogênese e metástase do tumor. Diante disso, a inibição da transcrição do fator NF-kB é um alvo importante na prevenção e progressão do câncer (AGGARWAL; BHARTI, 2003; ALOK *et al.*, 2017; BACHMEIER; KILLIAN; MELCHART, 2018; KAZAZIS *et al.*, 2014; ZLOTOGORSKI *et al.*, 2013).

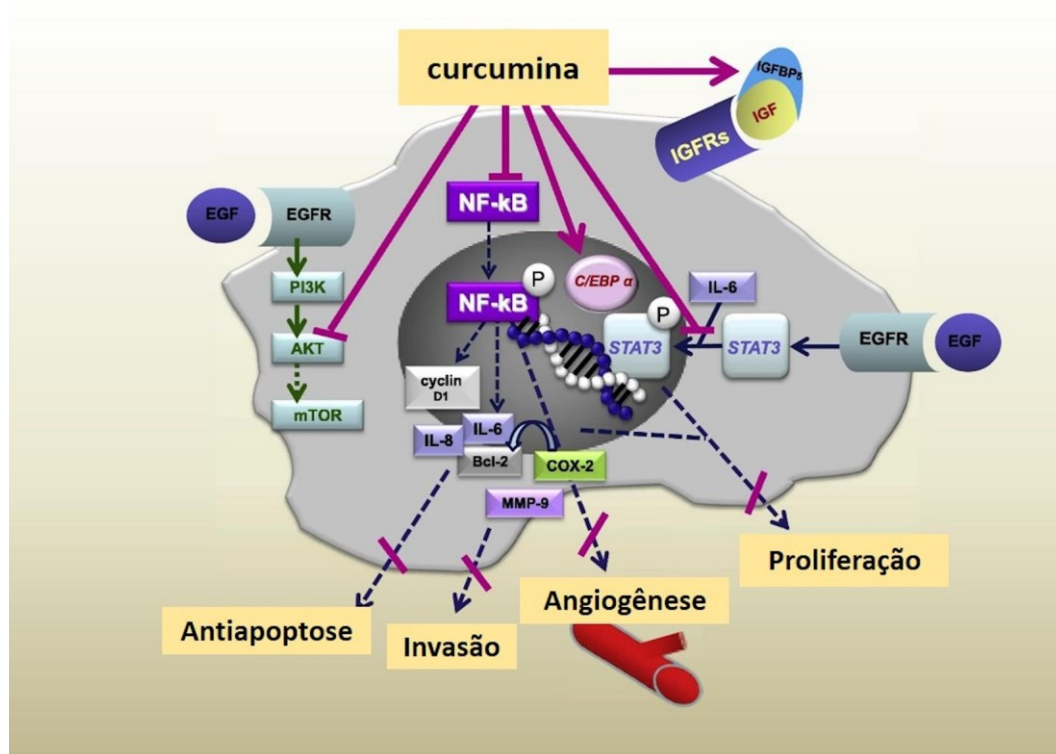
Estudos demonstraram que o tratamento de linhagens celulares de CEC com CUR inibiu a ativação do NF-kB, por meio do bloqueio da atividade do complexo de proteína quinase (IKK), necessário para sua fosforilação e entrada no núcleo. Isso levou à supressão da expressão de produtos necessários para sobrevivência e proliferação celular, tais como a proteína antiapoptótica Bcl-2; proteína reguladora de ciclo celular ciclina D1; interleucina 6 (IL-6), associadas à tumorigênese e à proteção da célula cancerosa; enzima ciclooxygenase-2 (COX-2), mediadora da angiogênese e do crescimento tumoral; e metaloprotease de matriz 9 (MMP-9), que degrada o colágeno da membrana basal, facilitando a invasão do estroma e vasos sanguíneos, fundamental para a metástase (AGGARWAL; BHARTI, 2003; WANG *et al.*, 2008; ZLOTOGORSKI *et al.*, 2013).

Outra alteração importante detectada no câncer de boca é a expressão elevada de receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), significativamente associados a alterações histológicas mais graves, pelo estímulo da proliferação celular. Tumores positivos para a forma ativada de EGFR são associados a um mau prognóstico e má resposta à quimioterapia (ZHEN *et al.*, 2014). Alguns estudos indicam que a CUR também está envolvida na regulação da expressão e vias de sinalização da EGFR, dada principalmente pela inibição da atividade da proteína quinase B (AKT), levando assim à

sua atividade anticancerígena pela redução da angiogênese e proliferação celular (CHEN et al., 2018b; FADUS et al., 2017; KHAN et al., 2018; PANDA et al., 2017; WANG et al., 2008; ZHEN et al., 2014).

A CUR ainda desempenha papel importante no câncer atuando sobre a proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3). Há evidências que essa proteína encontra-se ativada por mediação da IL-6, em diversos tipos de câncer, incluindo no CEC, promovendo resistência à apoptose. A CUR, nesse caso, se mostrou como um potente inibidor da STAT3, resultando na redução da proliferação celular (CHAKRAVARTI; MYERS; AGGARWAL, 2006; SIVEEN *et al.*, 2014; ZLOTOGORSKI *et al.*, 2013). Trabalhos ainda apontam a CUR como indutora da atividade da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 5 (IGFBP-5) e da proteína estimuladora de ligação alfa (C/EBP  $\alpha$ ), as quais estão intimamente envolvidas na supressão de cânceres de cabeça e pescoço. Os efeitos inibitórios da CUR sobre essas proteínas levou à redução da tumorigênese em um modelo *in vivo* (WILKEN *et al.*, 2011). Um resumo esquemático demonstrando os mecanismos de atividade antitumoral da CUR no CEC é apresentado na Figura 4.

Figura 4. Mecanismos de ação descritos para a curcumina no CEC.



Fonte: Adaptado de Zlotogorski *et al.* (2013).

Apesar do seu potencial terapêutico e segurança já comprovados, a CUR tem sua aplicação clínica limitada devido às suas propriedades físico-químicas intrínsecas. Muitos estudos apontaram concentrações plasmáticas e teciduais baixíssimas ou até mesmo indetectáveis em humanos após administração oral, mesmo quando altas doses foram administradas (12 g/dia). A obtenção de tais resultados tem sido explicada em decorrência da sua baixa solubilidade aquosa (11 ng/mL em pH 5); baixa estabilidade química em pH fisiológico; baixa permeabilidade intestinal, devido em parte ao metabolismo intestinal de primeira passagem e acúmulo intracelular; extenso metabolismo hepático, o qual leva à formação de metabólitos por meio de reações de conjugação (via oral) ou redução (via intravenosa e intraperitoneal); e rápida excreção via vesícula biliar. Estudos *in vivo* demonstraram que cerca de 90% da CUR administrada por via oral é excretada nas fezes (CAS; GHIDONI, 2019; KHAN *et al.*, 2018; NAKSURIYA *et al.*, 2016; SALEHI *et al.*, 2019; SIVIERO *et al.*, 2015; TODEN; GOEL, 2017).

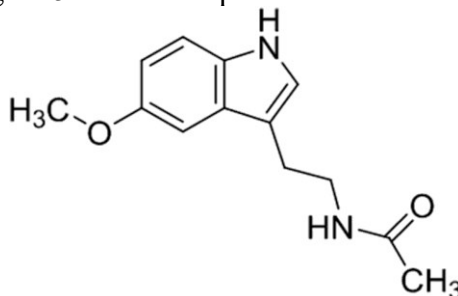
Como consequência, a biodisponibilidade oral da curcumina é extremamente limitada, sendo um composto pertencente à classe IV do sistema de classificação biofarmacêutico (SCB). Além disso, a CUR é sensível às condições ambientais, incluindo temperaturas elevadas, luz e umidade, características que também limitam sua aplicação (JIANG; LIAO; CHARCOSSET, 2020; KURIEN; MATSUMOTO; SCOFIELD, 2017; PAOLINO *et al.*, 2016). Para superar esses problemas inúmeras estratégias têm sido adotadas, tais como a administração concomitante de piperina, um inibidor conhecido da glucoronidação hepática e intestinal, o uso de análogos estruturais como o óleo essencial de tumérico, e a encapsulação em nano- e micropartículas lipídicas e poliméricas (LOPRESTI, 2018; PAOLINO *et al.*, 2016).

### 3.3 MELATONINA

A melatonina (MEL) ou N-acetil-5-metoxi-triptamina (Figura 5) foi isolada pela primeira vez em 1958 a partir da glândula pineal bovina e desde então vem sendo estudada como uma molécula multifuncional. A MEL é encontrada naturalmente em organismos unicelulares, fungos, plantas e animais (HAJAM *et al.*, 2020; HARDELAND, 2016; KOSTOGLU-ATHANASSIOU, 2013; KUBATKA *et al.*, 2018). É uma molécula de natureza anfifílica de baixo peso molecular (232.28 g/mol), com um Log *P* de 1,6 e pKa de 4,4, apresentando baixa solubilidade em água (0,1 mg/mL) (FILALI *et al.*, 2017;

JOHNS, 2011). Devido sua estrutura indólica bicíclica rica em elétrons, a MEL é uma potente sequestradora de EROs, com maior atividade antioxidante que a vitamina E e a glutatona, além de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (CUTANDO *et al.*, 2012; GORADEL *et al.*, 2017; KOSTOGLU-ATHANASSIOU, 2013).

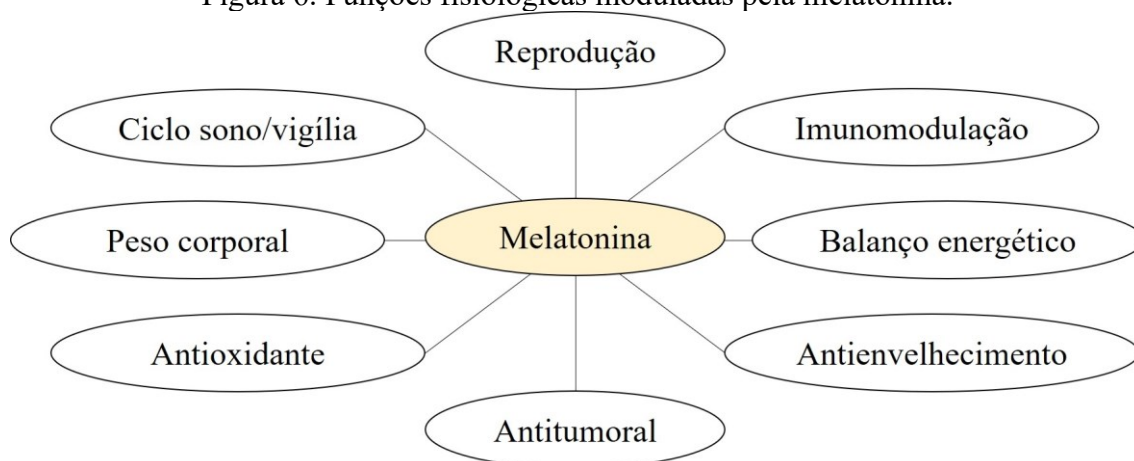
Figura 5. Estrutura química da melatonina.



Fonte: Filali *et al.* (2017).

Nos mamíferos, a biosíntese da MEL ocorre principalmente na glândula pineal, sendo derivada da serotonina, a qual por sua vez, tem como precursor o triptofano. Sua síntese também se dá em menor quantidade em outros órgãos, porém estima-se que tenham contribuição mínima para sua concentração plasmática. A MEL produzida na glândula pineal passa livremente através das membranas, atingindo todas partes do corpo, enquanto aquela produzida em outros tecidos aparentemente atua de forma parácrina. Os receptores de MEL estão presentes em diversas regiões do cérebro, sistema cardiovascular, sistema imunológico, testículos, ovário, pele, fígado, rim, córtex adrenal, placenta, mama, retina, pâncreas e baço, sugerindo um grande número de funções, as quais são dependentes da localização e dos tipos de receptores ativados (CARPENTIERI *et al.*, 2017; MAGANHIN *et al.*, 2008; TORDJMAN *et al.*, 2017). Os vários papéis fisiológicos atribuídos à MEL encontram-se resumidos na Figura 6.

Figura 6. Funções fisiológicas moduladas pela melatonina.



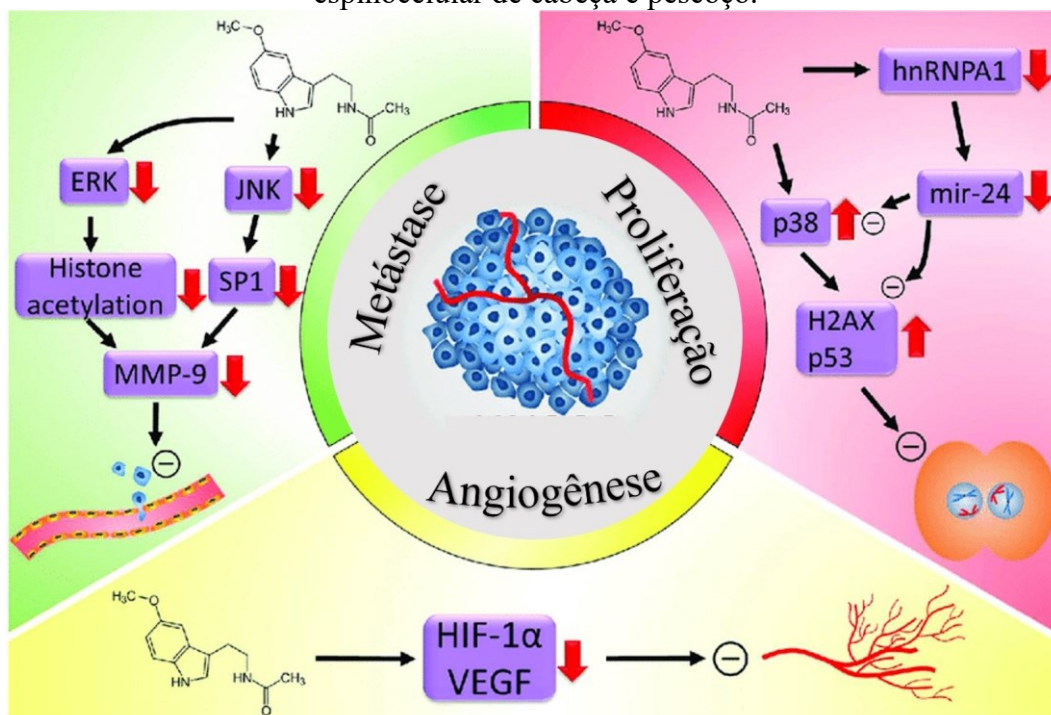
Fonte: Adaptado de Garrido; Terrón; Rodríguez (2013).

Certamente, a função biológica mais bem descrita para a MEL está relacionada ao ritmo do ciclo circadiano, no controle do ciclo sono/vigília. Nesse caso, a retina é estimulada pelos raios luminosos que desencadeiam estímulos nervosos que, por sua vez, são enviados para o córtex visual, passando pelos núcleos supraquiasmáticos, chegando até a glândula pineal, e levando à redução dos níveis de MEL (ARMIJO *et al.*, 2013; ASGHARI *et al.*, 2018; KOVACIC; SOMANATHAN, 2014; SÁNCHEZ; CALPENA; CLARES, 2015; SRINIVASAN *et al.*, 2012). A MEL sintetizada é liberada a noite pela glândula pineal, de forma rítmica e determinada pelo ciclo circadiano. Sua natureza anfifílica permite fácil difusão através células, onde exerce ação antioxidante, interage com receptores nucleares e impede a interação do complexo cálcio-calmodulina com proteínas alvo (PEVET; KLOSEN; FELDER-SCHMITTBUHL, 2017).

As ações fisiológicas da MEL são mediadas principalmente pela ativação de receptores de membrana acoplados a proteína G, denominados MT1 e MT2, que promovem a inibição da enzima adenilato ciclase em células alvo. Entretanto, a MEL também pode desempenhar sua ação de forma não dependente de receptores, devido a sua capacidade de modular a atividade da calmodulina (CARPENTIERI *et al.*, 2017; JUNG; AHMAD, 2006; PEVET; KLOSEN; FELDER-SCHMITTBUHL, 2017; TORDJMAN *et al.*, 2017). A constatação da existência de receptores MT1 e MT2 em células da mucosa bucal saudáveis e cancerosas sugere que a MEL possa atuar como um agente anti-inflamatório, antioxidante e antitumoral, na cavidade oral (CARPENTIERI *et al.*, 2017; NAJEEB *et al.*, 2016). Seu efeito oncostático vem sendo estudado em vários tipos de câncer, tais como, mama, ovário, próstata, fígado, intestino, cabeça e pescoço (GORADEL *et al.*, 2017; MEHTA; KAUR, 2014; TORDJMAN *et al.*, 2017). O efeito

antitumoral descrito para a MEL no CCP tem sido relacionado principalmente com a atividade antiproliferativa e antiangiogênica, aumento da apoptose, e inibição de metástase (Figura 7).

Figura 7. Mecanismos oncostáticos propostos para a melatonina sobre o câncer espinocelular de cabeça e pescoço.



Fonte: Adaptado de Yeh *et al.* (2017).

É sabido que altos níveis de MMP-9 estão presentes em casos de câncer com grande potencial de invasão e metástase (PEREIRA *et al.*, 2006). A MEL, nesse caso, se mostrou capaz de inibir a expressão de MMP-9 por meio das vias de sinalização ERK/JNK (quinase regulada pela sinalização extracelular/c-Jun N terminal quinase), para mediar a acetilação das histonas e expressão do fator de transcrição de proteína 1 (SP1) (YEH *et al.*, 2017).

A MEL também foi capaz de inibir a proliferação celular no CCP através da regulação positiva das proteínas p38, p53 e da histona H2AX, que se associam ao bloqueio do ciclo celular, e da regulação negativa da ribonucleoproteína heterogênea nuclear A1 (hnRNPA1), superexpressa no CCP e responsável por expressar vários genes associados à fase G2/M do ciclo celular (GKOUVERIS; NIKITAKIS; SKLAVOUNOU, 2020; YEH *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2015). Por outro lado, o processo de inibição da angiogênese desencadeado pela MEL

nesse câncer tem sido associado à inibição da função do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), devido ao bloqueio da enzima necessária para o seu estímulo, além de uma possível desestabilização do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1), por meio da sua atividade antioxidante (D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018; GORADEL *et al.*, 2017; YEH *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2017).

A MEL ainda parece ter capacidade de aumentar a sensibilidade de forma seletiva de células tumorais a diferentes agentes antineoplásicos, fatores endógenos e radiação ionizante. Os mecanismos envolvidos parecem se relacionar com a modulação dos receptores alvo dos fármacos, redução da depuração dos fármacos por meio da regulação negativa das enzimas metabolizadoras e transportadoras, comprometimento no processo de reparo do DNA celular, aumento da apoptose e autofagia, e modulação das vias de transdução de sinal envolvidas manutenção da sobrevivência celular. Os mecanismos de ação pleiotrópicos da MEL são bastante interessantes, já que as células tumorais empregam múltiplos mecanismos para garantir sua sobrevivência e desenvolver resistência ao tratamento quimioterápico (ASGHARI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2017a; LIU; MADU; LU, 2018).

Considerando as evidências levantadas até o momento, a MEL pode ser considerada um potencial agente terapêutico, tanto para a prevenção quanto para o tratamento do câncer, especialmente em combinação com outros fármacos quimioterápicos. A Tabela 2 descreve alguns dos efeitos da MEL no tratamento do câncer.



Tabela 2. Estudos envolvendo a utilização de melatonina no câncer de cabeça e pescoço.

Tipo de estudo	Tipo de ensaio	Tratamento/Dose	Resultados obtidos	Referência
<i>In vivo</i>	Estudo clínico randomizado: 100 Pacientes com tumores sólidos metastáticos, incluindo 27 com CCP	Cisplatina+ Etoposíeio combinando ou não com 20 mg/dia de MEL	↑Taxa geral de regressão do tumor ↑Sobrevida em cinco anos	LISSONI <i>et al.</i> , 2003
<i>In vitro</i> <sup>1</sup>	Tratamento SCC25 e SCC9	100 µM	↓VEGF ↓HIF-1	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
<i>In vitro</i> <sup>1</sup>	Tratamento em HSC3 e OECM1	1 mM	↓MMP-9 ↓Acetilação da histona	YEH <i>et al.</i> , 2016
<i>In vitro</i> <sup>1</sup>	Tratamento em Cal27 e SCC9	Até 1,5 mM + radiação ou Cisplatina	↑Citotoxicidade da radiação e Cisplatina	FERNANDEZ-GIL <i>et al.</i> , 2019
<i>In vitro</i> <sup>1</sup> / <i>In vivo</i>	Tratamento em SCC9; SAS; SASV16; SASV32; SCC9V16; SCC9V32 e camundongo	<i>In vitro</i> : até 2 mM <i>In vivo</i> : 200mg/g	Apoptose em células resistentes a Vincristina via AKT, p38 Redução da resistência a Vincristina	HSIEH <i>et al.</i> , 2020

<sup>1</sup> Linhagens de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. CAL27, SCC25, SCC9, HSC3, SAS: Carcinoma epidermóide oral. OECM-1: Carcinoma escamoso oral humano. SASV16, SASV32, SCC9V16, SCC9V32: Carcinoma epidermóide oral resistente a Vincristina.

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Na prática clínica, a MEL tem sido utilizada principalmente para tratar distúrbios do sono e/ou *jet lag*. A forma farmacêutica mais comumente utilizada é o comprimido de administração oral em dosagens que podem chegar em até 10 mg (GOONERATNE *et al.*, 2012). Alguns estudos demonstraram que a biodisponibilidade oral da MEL exógena é altamente variável, dependendo da dose e da forma farmacêutica utilizada. Estudos mostraram que a biodisponibilidade absoluta da MEL após a administração oral de comprimidos (4-10 mg) variou de 3 até 15%, levando em média 40 minutos ( $t_{max}$ ) para alcançar o nível sérico máximo, e tendo tempo de meia-vida plasmática ( $t_{1/2}$ ) de aproximadamente 45 minutos (DEMURO; NAFZIGER; BLASK, 2000; HARPSOE *et al.*, 2015; PROIETTI *et al.*, 2014). A baixa biodisponibilidade oral da MEL tem sido ser atribuída a sua baixa solubilidade, reduzida absorção e ao extenso metabolismo de primeira passagem (DEMURO; NAFZIGER; BLASK, 2000; KIKWAI *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2017b, 2018b).

Diante de tais circunstâncias tão comuns na área farmacêutica é necessário a busca por estratégias com o intuito de incluir na terapêutica habitual fármacos com grande potencial terapêutico, porém com limitada ação devido à baixa biodisponibilidade oral. Existe um número crescente em publicações envolvendo a MEL em sistemas nanoparticulados. Tais sistemas de liberação são baseados em nanotecnologia e visam melhorar a solubilidade, perfil de liberação e biodisponibilidade, independente da via de administração escolhida (LI et al., 2018b).

### 3.4 USO DE NANOCARREADORES NO TRATAMENTO DO CÂNCER

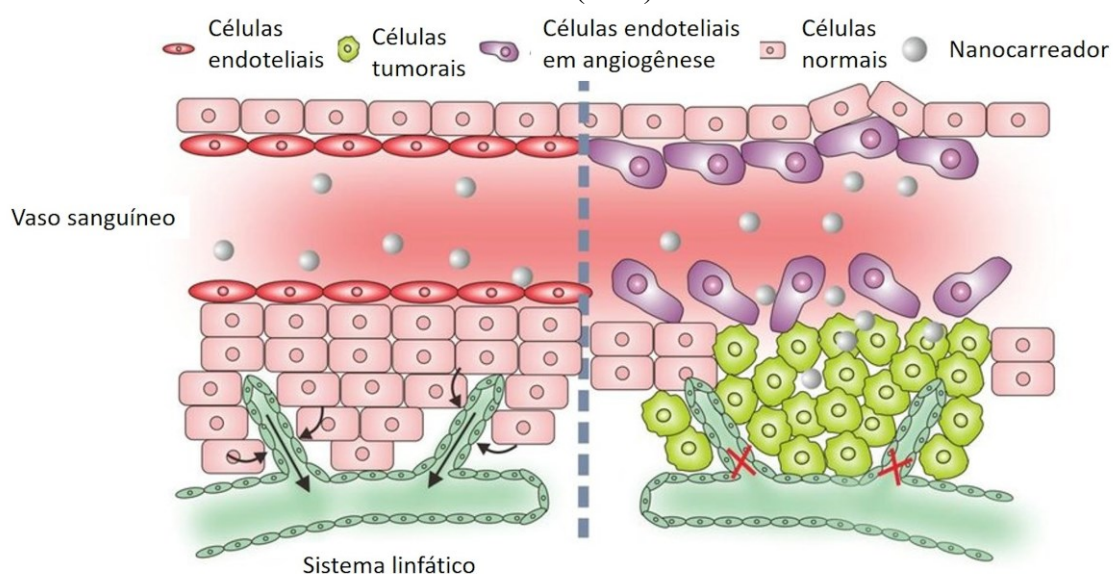
A quimioterapia convencional utilizada atualmente no tratamento do câncer se baseia em fármacos de baixo peso molecular, geralmente inferiores a 1000 Da. Isso permite que essas moléculas atravessem facilmente o endotélio podendo alcançar quase todas as regiões do organismo, levando a uma baixa especificidade, elevada toxicidade e efeitos colaterais. Essa ampla distribuição contribui para a obtenção de um perfil farmacocinético desfavorável, muitas vezes incluindo tempo de meia-vida curto e acúmulo fora do tecido ou célula alvo (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; GOLOMBEK *et al.*, 2018; VIEIRA; GAMARRA, 2016).

A baixa distribuição dessas moléculas nas regiões tumorais tem sido superada pela utilização de nanocarreadores (NC) como sistemas de liberação desses fármacos. Atualmente, muitas terapias que utilizam NC como veículos para fármacos estão em uso clínico e muitas outras se encontram em estágios de desenvolvimento pré-clínico e clínico (BATRA; PAWAR; BAHL, 2018; ZHANG *et al.*, 2008). Desde a aprovação do Doxil® (doxorubicina lipossomal) pela FDA em 1995, mais de 50 medicamentos baseados em NC entraram na prática clínica (BATRA; PAWAR; BAHL, 2018; CASTER *et al.*, 2017; MIRZA; SIDDIQUI, 2014; YETISGIN *et al.*, 2020; YOUN; BAE, 2018).

Os NC são preparados a partir de uma ampla variedade de materiais, podendo dispor o fármaco dissolvido, disperso ou ligado covalentemente ao sistema de dimensão nanométrica (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; MOHANRAJ; CHEN, 2006). As propriedades dos NC, incluindo seu tamanho em nanoescala, aumento considerável da área superficial em relação ao seu volume e possibilidade de proporcionar uma liberação controlada, trazem alguns benefícios como a melhora da solubilidade, redução da taxa de depuração fisiológica e/ou de degradação, aumento da biodisponibilidade, redução da

toxicidade sistêmica e melhora da eficácia terapêutica dos fármacos (BATRA; PAWAR; BAHL, 2018; CASTER *et al.*, 2017). A redução da toxicidade e melhora da eficácia da terapia antitumoral está relacionada sobretudo à capacidade dos NC em se acumular passivamente nos tecidos tumorais, por um mecanismo conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentados (EPR, do inglês *enhanced permeability and retention effect*, Figura 8). Isto se deve ao intenso processo de angiogênese que ocorre nos tumores, que faz com que o endotélio dos novos vasos seja defeituoso, permitindo o extravasamento de partículas submicrométricas para os tecidos tumorais. Em contrapartida, o estreito espaço das células endoteliais da vasculatura dos tecidos normais (15 – 30 nm) impede o extravasamento dos NC, reduzindo assim os efeitos indesejáveis ocasionados pelos compostos quimioterápicos às células saudáveis (SANEJA *et al.*, 2018; SEBASTIAN, 2017; TRAN *et al.*, 2017).

Figura 8. Mecanismo passivo de aumento da retenção e permeabilidade vascular em tumores (EPR).



Fonte: Adaptado de Xie *et al.* (2018).

Os NC podem ainda ter a sua superfície funcionalizada com ligantes, tais como proteínas, peptídeos, glicoproteínas (transferrina), ácidos nucleicos, vitaminas (ácido fólico) e fatores do crescimento, que podem interagir especificamente com receptores superexpressos nas células tumorais, sendo vetorizados ativamente para estas células (DIN *et al.*, 2017; YETISGIN *et al.*, 2020). Considerando que a proposta deste

trabalho consiste em vetorizar NC para células de câncer de boca que expressam o receptor CD44, uma revisão mais aprofundada sobre o tema é descrita abaixo.

### 3.4.1 Vetorização ativa baseada no receptor CD44

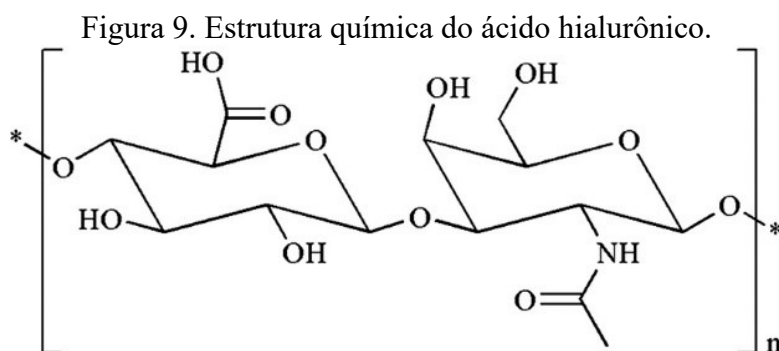
As células tumorais apresentam propriedades únicas que as diferenciam das células saudáveis. Alguns receptores são superexpressos somente em células tumorais e podem servir como alvo para liberação sítio específica de fármacos. Os NC podem ser direcionados às células por meio de ligantes conjugados em sua superfície que tenham afinidade por esses receptores específicos. Dessa forma, ao se ligarem às células, os NC são internalizados por endocitose mediada pelo receptor, proporcionando um maior acúmulo dos fármacos na região tumoral e a redução dos efeitos colaterais relativos ao efeito sobre células saudáveis (ETMAN *et al.*, 2020; MUHAMAD; PLENGSURIYAKARN; NA-BANGCHANG, 2018; SUTRADHAR; AMIN, 2014).

Várias evidências sugerem que apenas uma pequena população de células dentro do volume total do tumor tem a capacidade de iniciar e manter o crescimento do mesmo, sendo denominadas células tronco associadas ao câncer (CTCs). As CTCs já foram identificadas e isoladas em vários tumores sólidos, incluindo o grupo de CCP. Essas células parecem ser as responsáveis pela resistência ao tratamento, invasão e metástase, implicando em recidiva tumoral (WU *et al.*, 2017). Oh e colaboradores (2013) realizaram um estudo utilizando marcadores de superfície para identificar populações de CTC no CCP. Estes autores demonstraram que apenas as células tumorais CD44+ foram capazes de dar origem a novos tumores *in vivo*, indo de encontro com outras literaturas que comprovam a superexpressão de receptores CD44 em uma grande variedade de tumores sólidos.

A família de proteínas CD44 (cluster de diferenciação 44) é uma classe de glicoproteínas transmembranares que atuam na adesão extracelular e transdução de sinal, mediando respostas celulares ao microambiente, mais especificamente a interação entre as células e a matriz extracelular (CHEN *et al.*, 2018a; MATTHEOLABAKIS *et al.*, 2015). Uma das funções desempenhadas pelo CD44 é a internalização de ácido hialurônico (HA) para realizar sua degradação no citoplasma e permitir que o mesmo desempenhe suas funções. Essa internalização ocorre devido a um domínio de ligação

específico presente no receptor com grande afinidade para o AH (BUKHARI *et al.*, 2018; LUDWIG *et al.*, 2019; TIWARI; BAHADUR, 2019).

O HA representado pela fórmula molecular  $C_{28}H_{44}N_2O_{23}$  (Figura 9) é um polissacarídeo aniônico linear composto por unidades repetitivas de dissacarídeos de ácido D-glucorônico e N-acetil-D-glucosamina, unidas alternadamente por ligações glicosídicas  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) e  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  3), com pKa entre 3–4; suas cadeias podem atingir massas molares de  $10^5 - 10^7$  Da (BUKHARI *et al.*, 2018; CHATTERJEE *et al.*, 2017; MERO; CAMPISI, 2014; TIWARI; BAHADUR, 2019).

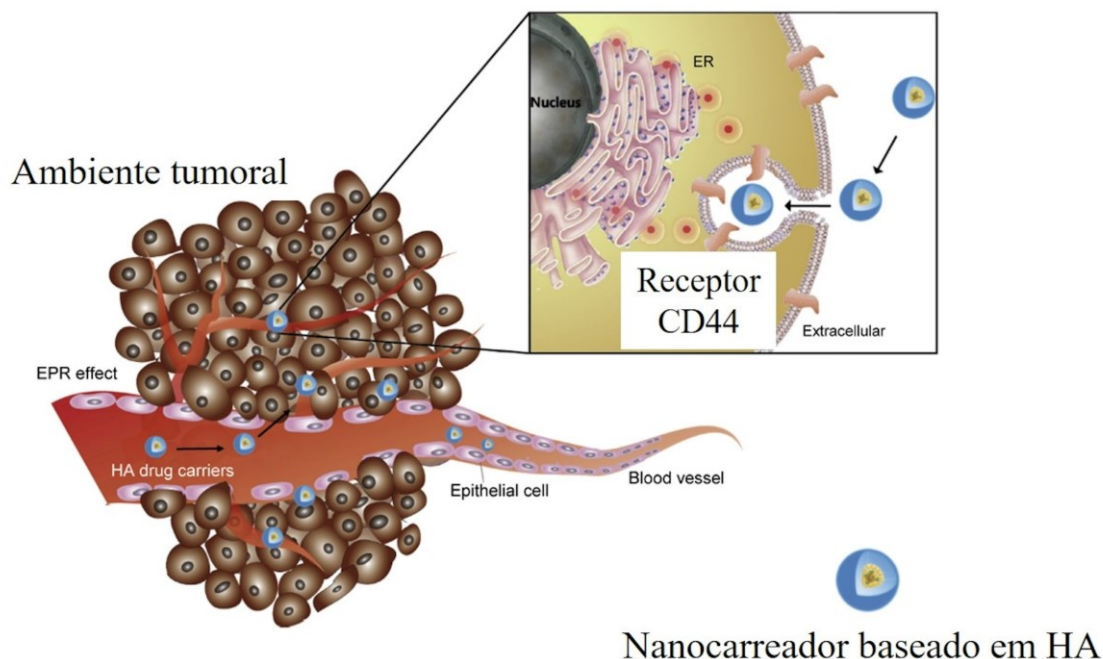


Fonte: Wang *et al.* (2014).

O HA é abundantemente encontrado na natureza. Nos vertebrados está localizado na matriz extracelular e pericelular, bem como no espaço intracelular. É o principal constituinte do humor vítreo e do líquido sinovial, se encontra em grande quantidade na pele e também se faz presente nos tecidos embrionários. A produção comercial do HA tem origem animal, sendo extraído do cordão umbilical e crista de galo, ou a partir de fermentação microbiana. Ambos apresentam a mesma estrutura, podendo diferir somente na massa molar (PAN *et al.*, 2013; TIWARI; BAHADUR, 2019). No estado sólido, sua conformação pode ser helicoidal simples ou dupla hélice, ambas estabilizadas por ligações de hidrogênio que unem açúcares adjacentes através de ligações glicosídicas. Em solução, as cadeias de HA se ligam fortemente às moléculas de água, devido ao grande número de grupos hidroxilas e carboxilas da sua estrutura, permitindo formar muitas ligações de hidrogênio, o que confere certo grau de rigidez à sua cadeia e alta capacidade de reter água, em cerca de mil vezes o seu peso. O HA assume então uma estrutura enovelada randômica semiflexível, que ocupa grande domínio hidrodinâmico com uma baixa densidade de cadeias (HUANG; CHEN, 2019; PAN *et al.*, 2013).

A constatação da afinidade entre o receptor CD44 e o HA impulsionou o desenvolvimento de muitos sistemas de liberação de fármacos antitumorais, visando a sua internalização pelas células cancerosas via processos endocíticos. O HA e seus derivados podem ser utilizados de forma conjugada com fármacos antitumorais ou empregados no revestimento de NC, como nanopartículas poliméricas, lipídicas ou nanoemulsões (WICKENS *et al.*, 2017; ZORZI *et al.*, 2017). Por exemplo, um medicamento contendo o paclitaxel conjugado ao HA (ONCOFID™-T, Fidia Pharma, Itália) encontra-se em estudos clínicos de fase II para o tratamento do câncer de ovário e de bexiga, enquanto o irinotecano conjugado ao HA (ONCOFID™- S, Fidia Pharma, Itália) tem sido testado para o carcinoma de ovário e carcinomatose peritoneal. Igualmente, a Alchemia Pharma Group (Austrália) desenvolveu uma plataforma para conjugação de diferentes fármacos quimioterápicos, como a doxorubicina, 5-fluoracila, irinotecano e irinotecano mais cetuximabe ao HA denominada HyACT® (KIM *et al.*, 2017). Os NC revestidos com HA têm se mostrado mais seletivos na entrega de fármacos no ambiente tumoral, uma vez que combinam a vetorização ativa por meio da interação com receptores CD44, com um mecanismo passivo baseado no EPR (Figura 10). De modo geral, os recentes avanços no desenvolvimento de formulações baseadas em HA têm proporcionado melhorias no combate à resistência a múltiplas drogas vista em alguns pacientes (WICKENS *et al.*, 2017).

Figura 10. Esquema de vetorização ativa promovida pelo revestimento do nanocarreador com ácido hialurônico e sua internalização mediada pelos receptores CD44.

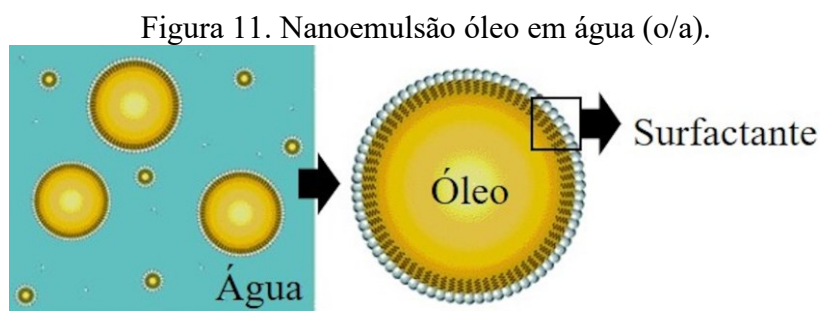


Fonte: Adaptado de Kim *et al.* (2017).

### 3.5 NANOEMULSÕES

Atualmente, uma grande variedade de NC tem sido investigada visando à administração sistêmica e liberação controlada e direcionada de fármacos no câncer, incluindo nanopartículas poliméricas e lipídicas, lipossomas, conjugados fármaco-polímero, entre outros. Os NC lipídicos, como as nanoemulsões, têm sido alvo de muitos estudos nos últimos anos, em função da sua alta biocompatibilidade e baixa toxicidade. Além disso, apresentam baixo custo e simplicidade na sua preparação (SHAKER *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2018; WAN *et al.*, 2016). Nanoemulsões (NE) são dispersões coloidais compostas por dois líquidos imiscíveis (água e óleo), nos quais um líquido é disperso no outro utilizando uma mistura de surfactantes apropriada que cria uma camada interfacial. Dependendo da proporção dos constituintes, as nanoemulsões podem ser dispersões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), ou ainda múltiplas (A/O/A), podendo dessa forma veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos. São sistemas que mesmo não sendo termodinamicamente estáveis, apresentam elevada estabilidade cinética em decorrência do seu tamanho de gotícula reduzido, geralmente entre 20 e 500

nm (SHAKER *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2017; ZORZI *et al.*, 2017). Considerando que a maioria dos compostos ativos em desenvolvimento, ou já disponíveis no mercado, apresentam baixa solubilidade em água, as NE do tipo O/A (Figura 11) acabam sendo alvo da maioria dos estudos envolvendo a liberação de fármacos (PENGON *et al.*, 2018; SHAKER *et al.*, 2019).



Fonte: Adaptado de McClements, (2012).

### 3.5.1 Composição

Embora não haja uma regra para a preparação das NE, a seleção criteriosa de diferentes óleos e surfactantes deve ser realizada para a obtenção de formulações com estabilidade adequada (ZORZI *et al.*, 2017). No caso das NE O/A, a fase oleosa compreende de 5 a 20% da formulação, podendo ser significativamente maior em alguns casos. Na sua composição são usadas frações reesterificadas obtidas a partir dos óleos de soja, semente de algodão, coco, amendoim, rícino, entre outros. Dependendo do tamanho da cadeia carbônica da porção éster, são denominados como triglicerídeos de cadeia longa (TCL), média (TCM) ou curta (TCC), e podem ser usados sozinhos ou em combinação (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; SINGH *et al.*, 2017).

Geralmente o tipo de óleo é eleito levando em consideração as características do fármaco, que deve preferencialmente manter-se solubilizado nessa fase. A estrutura e massa molecular de seus componentes também devem ser avaliadas, pois tem relação direta com o principal mecanismo de desestabilização das NE, o amadurecimento de Ostwald. Nesse processo, ocorre o crescimento do raio da gotícula e a diminuição do número total das gotículas dispersas. Esse mecanismo é causado pela difusão das moléculas na fase dispersa através do meio contínuo. No caso das NE O/A, a taxa do amadurecimento de Ostwald depende da solubilidade do óleo na água, sendo mais pronunciado em formulações que contêm óleos contendo compostos de massa molecular



menor e tamanhos de cadeia carbônica mais curtos. Este processo pode ocasionar a separação das fases ao longo do tempo (FRANZOL; REZENDE, 2015; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; MASON *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2017).

Outro componente crucial na formulação de uma NE são os surfactantes. Esses são moléculas anfífilas que têm papel fundamental na deformação e quebra das gotículas, reduzindo a tensão interfacial e impedindo a coalescência durante o processo de emulsificação, uma vez que são rapidamente adsorvidos na interface óleo/água (SAFAYA; ROTLIWALA, 2019; SILVA *et al.*, 2015c; SINGH *et al.*, 2017). A distribuição do surfactante entre as fases depende de fatores como: valor do EHL (Equilíbrio hidrofílico-lipofílico) do surfactante, natureza do óleo, forças interfaciais, condições térmicas e interação entre surfactante e os demais componentes da formulação (PAVONI *et al.*, 2020; POLYCHNIATOU; TZIA, 2014; SAFAYA; ROTLIWALA, 2019; SILVA *et al.*, 2015c).

De forma geral, a estrutura dos surfactantes pode ser expressa como R-X, sendo que R é uma cadeia de hidrocarboneto com 8 a 18 átomos de carbono e X é o grupamento polar. Dependendo da presença de carga do grupo polar, os surfactantes podem ser classificados como não iônicos, iônicos (catiônicos ou aniônicos) e anfóteros (MANIASSO, 2001; SILVA *et al.*, 2015c). Essa propriedade influencia no mecanismo de estabilização das NE. Enquanto surfactantes não iônicos promovem a estabilização das nanoemulsões por meio de interações do tipo dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio com a camada de hidratação ou por impedimento estérico promovido pela adsorção de grandes moléculas na interface o/a (ex., surfactantes poliméricos), surfactantes iônicos promovem a estabilização por meio da repulsão eletrostática entre os seus grupos ionizáveis (PAVONI *et al.*, 2020).

Para obtenção de NE com estabilidade a longo prazo e tamanho de gotículas reduzidos é indicado a combinação de surfactantes ou utilização de co-surfactantes, uma vez que alguns compostos podem não reduzir a tensão interfacial de forma eficiente, sendo necessária a adição de um segundo componente capaz de fortalecer o filme interfacial, aumentando a entropia do sistema (POLYCHNIATOU; TZIA, 2014; RAI *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2017). Fosfolípidos de origem natural como as lecitinas têm sido bastante empregados nestes sistemas de liberação. As lecitinas constituem uma mistura complexa de fosfolípidos de natureza anfótera que podem ser extraídos da gema do ovo ou da soja. Em pH fisiológico, uma pequena porção de seus grupamentos polares

são carregados negativamente, o que contribui com estabilidade a longo prazo da formulação, pois conferem uma carga negativa superficial, o que permite uma repulsão eletrostática entre as gotículas dispersas. Surfactantes não iônicos como os poloxâmeros e ésteres do sorbitano etoxilados (Tweens) têm se mostrado promissores em combinação com os fosfolípidos, uma vez que levam a formação de filmes mistos compactos, resultando em maior estabilidade às NE (BRUXEL *et al.*, 2012). Além disso, tem sido reportado que os surfactantes não iônicos são menos tóxicos, quando comparados aos iônicos (KALE; DEORE, 2017; RAI *et al.*, 2018; SOBHANI *et al.*, 2015).

Os surfactantes iônicos, apesar de menos utilizados podem ser adicionados à formulação com diferentes intuitos. Surfactantes aniônicos, como o ácido oleico podem ser incluídos com o objetivo de aumentar a carga negativa na interface do sistema, provocando uma maior repulsão eletrostática entre as gotículas, contribuindo assim com a estabilidade do sistema (BRUXEL *et al.*, 2012). Os sais de amônio quaternário como a oleilamina (OA) e brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) formam a classe mais conhecida de surfactantes catiônicos (SILVA *et al.*, 2015c). A adição desses lipídios catiônicos é vista quando se deseja associar ácidos nucleicos à estrutura coloidal ou na tentativa de promover uma maior internalização celular da formulação (KHACHANE *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2017). Além disso, os surfactantes catiônicos podem funcionar como ferramenta capaz de anexar ligantes à superfície das NE visando o direcionamento ativo de fármacos em certos tipos de câncer (KIM *et al.*, 2019b).

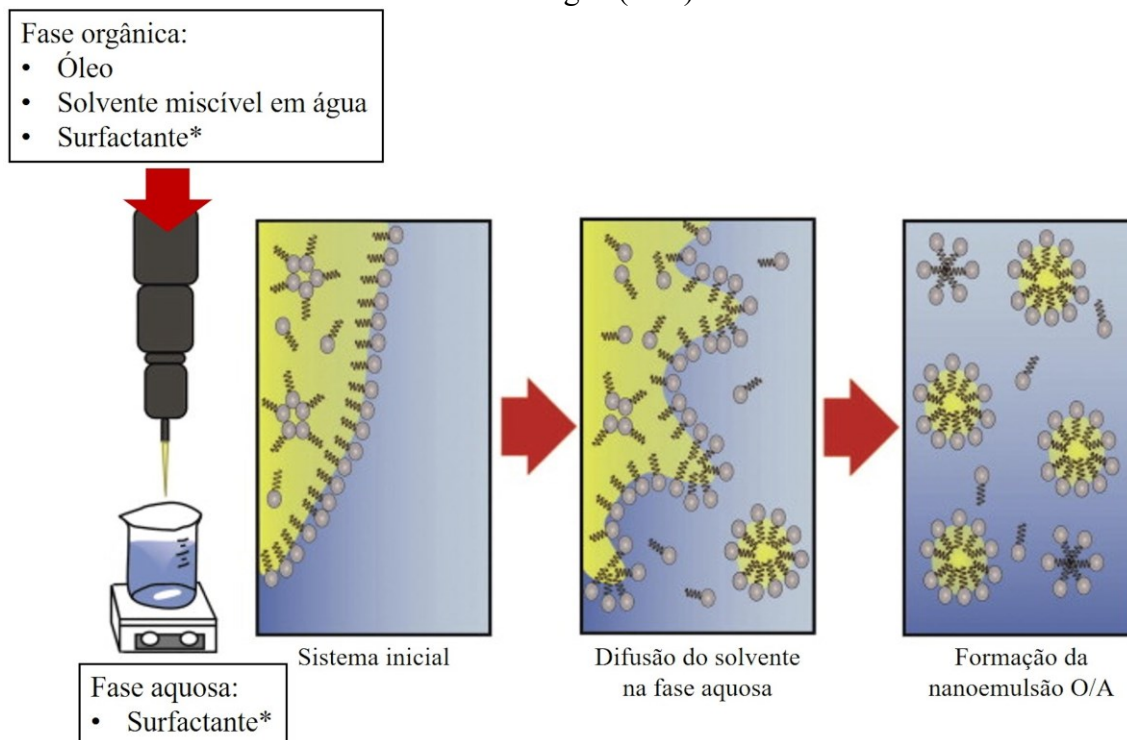
### 3.5.2 Métodos de preparação e estabilidade

A formação de NE necessita de aporte de energia. Sendo assim, os métodos de obtenção são classificados como sendo de alta e baixa energia. Os métodos de alta energia envolvem o uso de dispositivos mecânicos que promovem uma taxa de cisalhamento suficiente para deformar as partículas, tais como homogeneizadores de alta pressão ou geradores de ultrassom. A aplicação dessa energia gera forças capazes de romper as gotas da fase dispersa, de forma que a diferença entre a pressão interna e externa da gota seja superada. A produção geralmente ocorre em duas etapas: a primeira se trata da preparação de uma emulsão grosseira seguida de uma segunda etapa para reduzir o diâmetro da gotícula (BRUXEL *et al.*, 2012; HELGESON, 2016; KOURNIATIS *et al.*, 2010).

Os métodos que envolvem alta energia são muito eficientes na redução do tamanho das gotículas, contudo, exigem equipamentos que podem aumentar o custo da operação. Além disso, as condições envolvidas nesses processos podem não ser adequadas para fármacos termossensíveis e macromoléculas; para esses é ideal a utilização de métodos de baixa energia (BRUXEL *et al.*, 2012). Uma das principais características desses métodos é a utilização de energia armazenada no sistema para produzir as gotículas (SINGH *et al.*, 2017). São levados em conta as propriedades dos surfactantes, óleo e fase aquosa que formam espontaneamente a NE com base em procedimentos simples de mistura ou alterações das condições do sistema. Os métodos de baixa energia são considerados particularmente interessantes, pois não requerem equipamentos especiais, são facilmente implementáveis, tem um baixo custo associado e, por envolver geração mínima de energia, evitam a degradação de fármacos lábeis durante o processo de formação das NE (ASWATHANARAYAN; VITTAL, 2019; KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2015).

Nesse trabalho foi adotado um método de baixa energia denominado emulsificação espontânea que ocorre por difusão do solvente para obtenção de NE do tipo O/A. Esse método é baseado na dispersão de uma fase orgânica em uma fase aquosa, com posterior evaporação dos solventes e redução do volume sob pressão reduzida. A fase orgânica é composta geralmente por óleo e um solvente miscível em água, contendo ou não de um surfactante lipofílico. Na fase aquosa são adicionados os componentes hidrofílicos da formulação, se assim houver, tais como surfactantes, conservantes, agente isotonzantes e outros. Após a homogeneização isolada dessas fases, a fase orgânica é injetada na fase aquosa sob agitação magnética constante. A rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa leva a uma turbulência interfacial (efeito Maragoni) que resulta na redução da tensão interfacial e na formação de gotas de tamanho reduzido, formando instantaneamente a NE. A agitação magnética é mantida por determinado tempo, permitindo que o sistema atinja o equilíbrio. Só depois o solvente orgânico é removido e a formulação concentrada até o volume desejado por evaporação sob pressão reduzida (AZMI *et al.*, 2019; BOUCHEMAL *et al.*, 2004; MCCLEMENTS, 2011; RAI *et al.*, 2018). Uma representação esquemática do processo de emulsificação espontânea é ilustrada na Figura 12.

Figura 12. Processo de emulsificação espontânea na obtenção de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A).

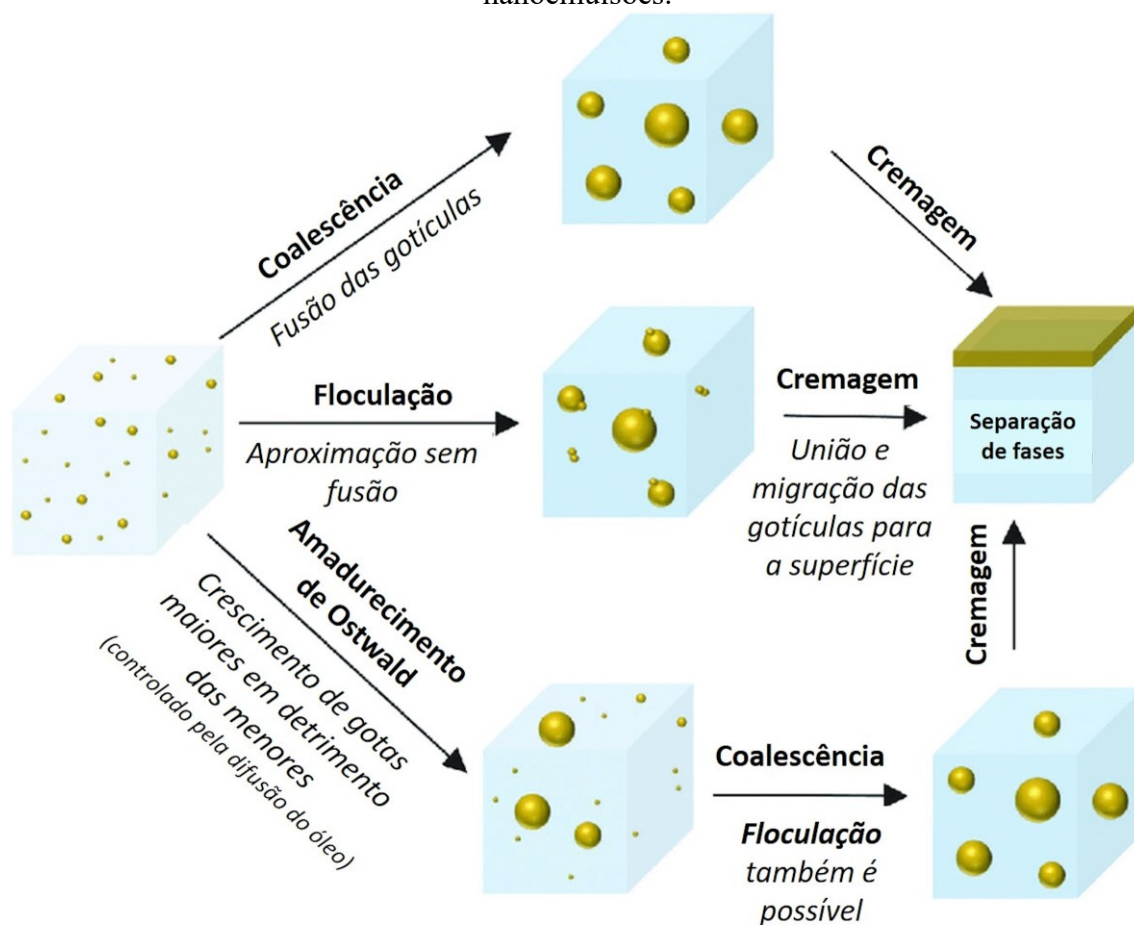


\* Esse componente pode ser adicionado em uma das fases ou em ambas.

Fonte: Adaptado de Komaiko; McClements, (2015).

Durante o período de armazenamento, as NE podem sofrer mecanismos de instabilidade, tornando-se mais turvas ou com separação de fases. Devido ao seu tamanho de gotícula nanométrico, o efeito do movimento browniano tende a ser dominante em relação à força gravitacional, o que torna esses sistemas cineticamente estáveis. Com isso, quando há desestabilização desse sistema, ela tende a ser muito mais lenta em comparação às emulsões ou dispersões grosseiras (KUMAR *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2018). A desestabilização das NEs pode ocorrer por qualquer um dos mecanismos mostrados na Figura 13, os quais são a floculação, coalescência, amadurecimento de Ostwald e cremagem/sedimentação.

Figura 13. Representação esquemática das diferentes rotas de desestabilização das nanoemulsões.



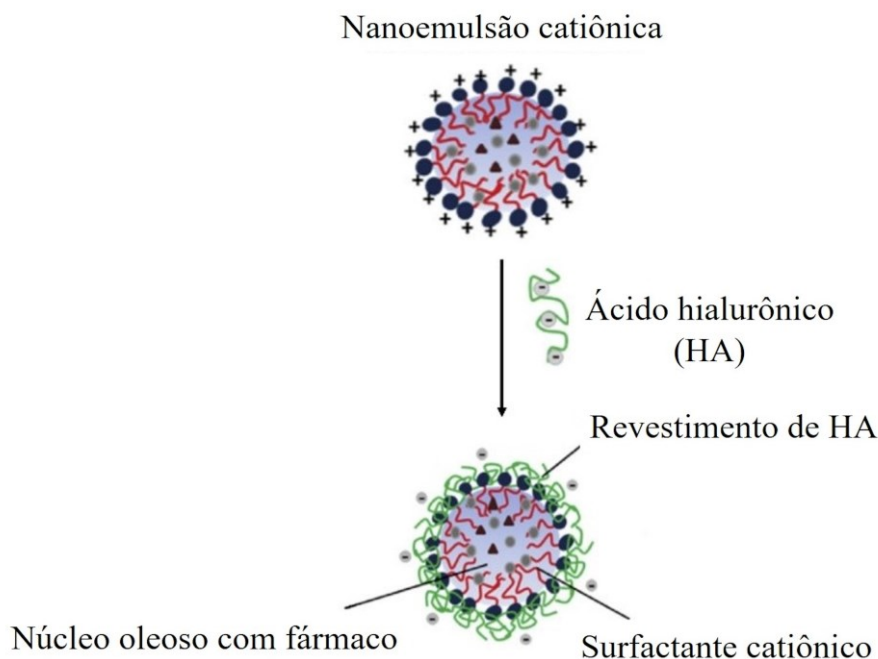
Fonte: Adaptado de Gupta *et al.* (2016).

Na floculação, as gotículas tornam-se próximas umas das outras devido a forças atrativas. Durante este processo, um primeiro contato entre as gotas é estabelecido, o que pode levar à coalescência, fenômeno no qual as gotículas fundem-se umas às outras, tornando-se maiores. O amadurecimento de Ostwald ocorre devido à diferença de potencial químico do soluto dentro de gotas de diferentes tamanhos, o que faz com que haja uma transferência de massa das gotas menores para as maiores, com consequente crescimento do tamanho das mesmas. Na cremagem e sedimentação, as gotas se movem em direção à superfície ou ao fundo do líquido respectivamente, o que é causado por uma diferença de densidade entre as fases dispersa e dispersante. Tais fenômenos mesmo que reversíveis podem levar à coalescência devido à proximidade das gotas da nanoemulsão (GUPTA *et al.*, 2016). A estabilidade das formulações é dependente da composição do sistema e parâmetros de processamento, que vão resultar em propriedades físico-químicas únicas (BRUXEL *et al.*, 2012).

### 3.5.3 Obtenção de nanoemulsões revestidas com ácido hialurônico

As primeiras abordagens encontradas na literatura envolvendo a adição de HA em plataformas de entrega de fármacos se baseavam na sua conjugação por meio ligações químicas com o fármaco ou outros componentes da formulação, tais como os polímeros. Entretanto, processos envolvendo a modificação química são muitas vezes complexos e pouco reprodutíveis. Como alternativa foram desenvolvidas metodologias que permitem a obtenção de conjugados por meio de interações eletrostáticas entre o HA carregado negativamente e componentes catiônicos dos NC (KIM et al., 2017; LUO; PRESTWICH, 1999; YANG et al., 2013a). A associação do HA por meio de interações eletrostáticas pode ser obtida utilizando na formulação polímeros catiônicos, tais como, polietilenoimina, quitosana e Eudragit® (DEY *et al.*, 2016; ELZOGHBY *et al.*, 2017; KALAM, 2016; MAIOLINO *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2020; PARASHAR *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2015, 2017) ou surfactantes e lipídios catiônicos, que incluem principalmente o CTAB, OA, cloreto de benzalcônio (BKC), brometo de dimetildioctadecilamônio (DDAB) e estearilamina (SA) (LEE et al., 2019; LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004; OYARZUN-AMPUERO et al., 2013; TINOCO et al., 2018; VANGARA; LIU; PALAKURTHI, 2013; YANG et al., 2013a; YENICE et al., 2008). A inclusão desses compostos nas formulações de NC leva à obtenção de partículas com carga superficial positiva que permite o revestimento (ou decoração/funcionalização) após incubação com uma solução de HA (LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004; LUO; PRESTWICH, 1999; OYARZUN-AMPUERO *et al.*, 2013; TINOCO *et al.*, 2018). A Figura 14 ilustra uma NE catiônica que foi revestida com HA pelo estabelecimento de interações eletrostáticas entre o surfactante catiônico e HA.

Figura 14. Esquema de obtenção de uma nanoemulsão revestida com ácido hialurônico por meio de interações eletrostáticas.



Fonte: Adaptado de Pradhan *et al.* (2015).

Oyarzun-Ampuero e colaboradores (2013) desenvolveram NE revestidas com HA para liberação do docetaxel a partir de NE catiônicas preparadas por emulsificação espontânea, compostas por uma fase orgânica contendo o óleo Mygliol<sup>®</sup>812 (mistura de TCMs), lecitina e um surfactante catiônico (CTAB ou BKC) dissolvidos em uma mistura de acetona e etanol que posteriormente foi vertida sobre uma fase aquosa. Depois de eliminar o solvente as NE foram incubadas com uma solução de HA (0,1 até 50 mg/mL) em uma proporção de 4:1,5. Seguindo metodologia semelhante Tinoco e colaboradores (2018) obtiveram um sistema semelhante para liberação de ácido retinóico a partir de uma fase orgânica contendo TCM, lecitina e SA e uma fase aquosa contendo glicerol e Tween<sup>®</sup> 80. A incubação foi realizada com uma solução aquosa de HA (0,01 até 4 mg/mL) na proporção de 1:1. As NE revestidas com HA obtidas em ambos trabalhos citados acima tiveram tamanho de gotícula inferior a 200 nm, com potencial zeta negativo, morfologia esférica e se mantiveram estáveis por 60 dias. Estudos *in vitro* utilizando linhagens de células tumorais demonstraram que a citotoxicidade dos fármacos pôde ser significativamente aumentada quando associado à este tipo de sistema (OYARZUN-AMPUERO *et al.*, 2013; TINOCO *et al.*, 2018). Isso demonstra que a técnica de emulsificação espontânea seguida de uma incubação com o HA pode ser promissora na

obtenção de NE revestidas com HA. Além disso, o revestimento com HA pode atribuir ao sistema propriedades mucoadesivas, característica importante quando se projeta um sistema de liberação de fármacos que necessite de contato prolongado com mucosas, como no caso da via de administração bucal, por exemplo (KIM *et al.*, 2019a; LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004).

### 3.6 ADMINISTRAÇÃO BUCAL DE FÁRMACOS

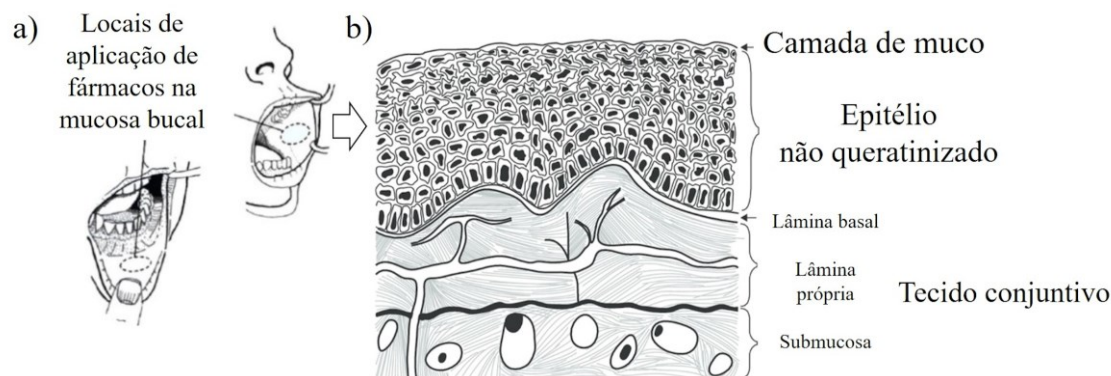
A exploração de vias alternativas para administração de medicamentos tem ganhado destaque, devido às dificuldades impostas pela administração parenteral e pela baixa biodisponibilidade de fármacos pela via oral (PURATCHIKODY *et al.*, 2011). Nesse sentido, a mucosa bucal apresenta muitas propriedades que a tornam uma via vantajosa, tais como, boa acessibilidade e fácil aplicação, o que resulta em boa adesão do paciente quando comparada a outras vias de administração. Além disso, a administração bucal evita processos como a degradação ácida, ocorrida no trato gastrointestinal, e o metabolismo de primeira passagem, o que contribui para o aumento da biodisponibilidade do fármaco. Ainda, a rápida renovação celular e alta tolerância a alérgenos resulta em uma baixa tendência à irritação ou dano permanente da mucosa da cavidade oral (HEARNDEN *et al.*, 2012; RUSSO *et al.*, 2016; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005; SILVA *et al.*, 2015b).

As regiões da mucosa bucal onde são usualmente administrados os medicamentos incluem as áreas da cavidade intraoral que revestem as bochechas, bem como a área entre as gengivas e parte interna dos lábios superiores e inferiores (Figura 15a) (BOBADE *et al.*, 2013; FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018; SATTAR; SAYED; LANE, 2014). A estrutura dessas áreas é ilustrada na Figura 15b, sendo composta por uma camada de células epiteliais não queratinizadas, contendo uma pequena quantidade de lipídios neutros e polares, o que lhe confere uma maior permeabilidade quando comparada a outras regiões da cavidade oral (KRAAN *et al.*, 2014; LAM *et al.*, 2014; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005; SHEORAN, 2018). Essa característica permite que essa via seja empregada tanto para tratamento sistêmico quanto local, sendo possível verificar citações na literatura que investigam sua aplicação sistêmica na diabetes mellitus, imunoterapia, dependência de nicotina, enxaquecas, neuralgia do nervo trigêmeo, entre outros. Para o tratamento de



condições locais, a administração bucal tem sido usada para o tratamento de doenças periodontais, cáries, dor de dente, infecções bacterianas e fúngicas, estomatites, aftas e adjuvante no câncer de boca (SCHOLZ et al., 2008; SHAH et al., 2016; SILVA et al., 2015b).

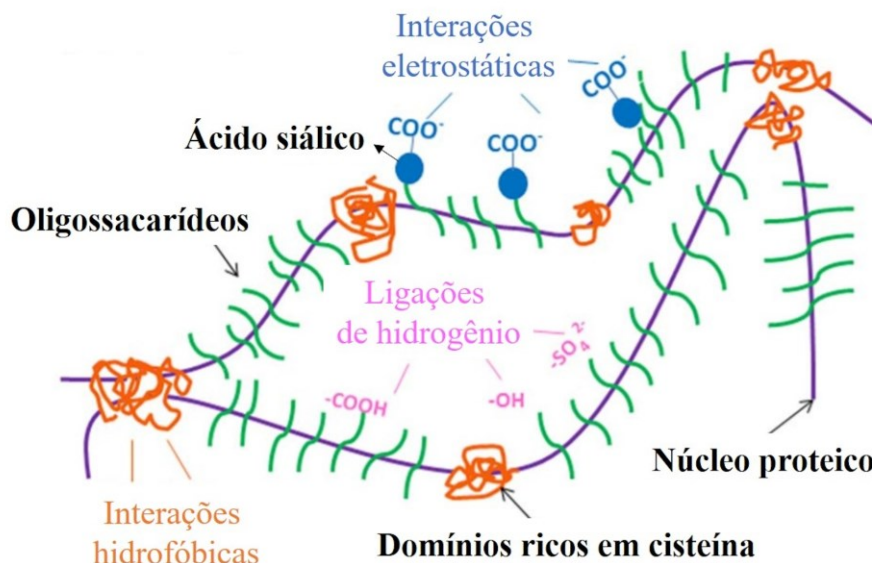
Figura 15. Regiões da cavidade oral utilizadas para administração bucal de fármacos (a) e representação da estrutura da mucosa bucal (b).



Fonte: Adaptado de Lam *et al.* (2014); Pather; Rathbone; Şenel (2008).

A superfície da mucosa bucal é revestida por uma fina camada de muco que faz parte da saliva secretada pelas glândulas salivares. Esse muco é uma secreção viscoelástica composta em grande parte por água (até 99%) e componentes solúveis na mesma, como proteínas, enzimas, eletrólitos, entre outros. O componente chave do muco é uma glicoproteína, a mucina (Figura 16), que embora esteja presente numa baixa concentração (até 1%), é responsável por proporcionar carga negativa ao mesmo em pH fisiológico (5,5 – 7). Essa carga é originada pela presença de resíduos da ionização de ácido siálico e de grupos sulfato, os quais proporcionam ao muco uma estrutura fortemente coesiva e gelatinosa que se liga à superfície das células epiteliais, funcionando proteção e barreira, mas podendo limitar a difusão de fármacos através da mucosa bucal (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018; GOSWAMI; JASTI; LI, 2008; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005; SATTAR; SAYED; LANE, 2014).

Figura 16. Representação da estrutura da glicoproteína mucina e seus domínios para possíveis interações.

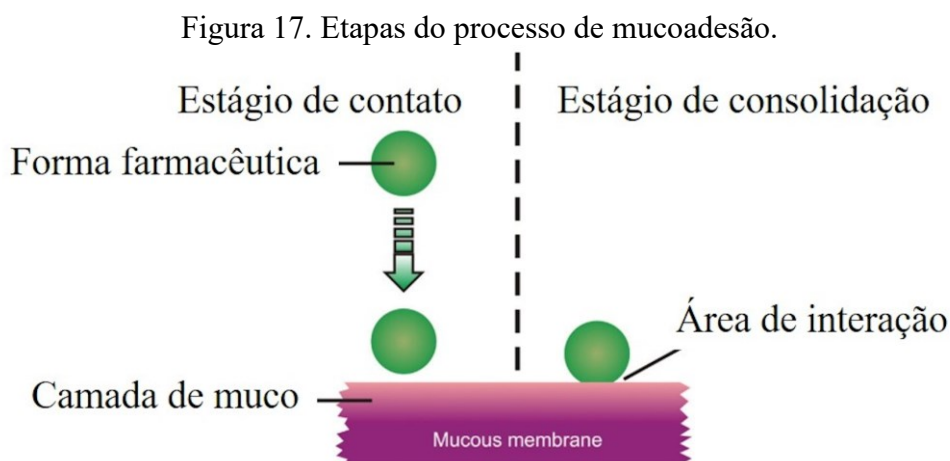


Fonte: Adaptado de Yang *et al.* (2012).

O principal desafio a ser vencido quando se trata da administração de fármacos pela via bucal é o tempo de residência das formas farmacêuticas. É necessário que se mantenha contato com a mucosa para permitir que o fármaco atue localmente ou seja absorvido por ela. No entanto, as tensões mecânicas resultantes do ato de mastigar, deglutir e falar, bem como o fluxo constante de saliva (1 – 2 mL/min) podem impedir o processo de aderência da formulação à mucosa, levando a uma redução da eficácia terapêutica, assim como a uma distribuição imprevisível do fármaco no local de ação ou de absorção (BOBADE *et al.*, 2013; SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006). Assim, para otimizar a ação terapêutica é necessário prolongar e melhorar o contato entre a forma farmacêutica e a mucosa. Para cumprir esse requisito as formulações destinadas à essa aplicação devem conter agentes mucoadesivos e manter um contato íntimo e prolongado (bioadesão) da forma farmacêutica com o local de ação e/ou absorção (ROSSI; SANDRI; CARAMELLA, 2005). A bioadesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, sendo pelo menos um deles biológico, são mantidos juntos por um longo período de tempo, mediado por forças interfaciais. Quando esses sistemas bioadesivos são destinados a membranas mucosas, denomina-se então esse processo como mucoadesão (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018).

A mucoadesão é resultado de múltiplos estágios de interação entre uma macromolécula mucoadesiva e a mucina presente no muco. A macromolécula deve entrar

em contato com a mucosa para iniciar o contato e promover a difusão de suas cadeias no muco. Nesse contato, forças atrativas e repulsivas ocorrem, mas para o sistema mucoadesivo ser eficiente as forças de atração devem ser dominantes. Dessa forma, o mecanismo de mucoadesão é dividido em duas etapas, estágio de contato e estágio de consolidação, como ilustrado na Figura 17 (BARTKOWIAK *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2010).



Fonte: Adaptado de Carvalho *et al.* (2010).

Muitos polímeros são exemplos de macromoléculas que podem ser consideradas mucoadesivas, podendo ser classificados quanto a sua origem como naturais ou sintéticos (PARTENHAUSER; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2016). A maioria dos polímeros mucoadesivos de origem sintética são derivados do ácido poli-acrílico e da celulose, como por exemplo, carbopol e carboximetilcelulose. Já os polímeros naturais, são derivados de plantas ou fontes animais. Polímeros mucoadesivos naturais são considerados na sua grande maioria como sendo polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos. Alguns exemplos incluem a quitosana, pectina, alginato de sódio, gelatina e AH (KAUSHIK; SHARMA; AGARWAL, 2016; PARTENHAUSER; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2016; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005).

O HA é um polímero natural aniônico considerado biodegradável, altamente biocompatível e não imunogênico. É bastante hidrofílico, podendo absorver grande quantidade de água e expandir até mil vezes seu volume. Quando em solução, apresenta uma conformação aleatoriamente enovelada, podendo esta contribuir com a propriedade mucoadesiva por meio do emaranhamento com a camada de muco. Considerando o pH da cavidade oral (5,5 – 7), a abundância de grupamentos carboxílicos do HA (pKa entre

3 – 4) possibilita a realização de muitas ligações de hidrogênio com a camada de muco (CHATTERJEE *et al.*, 2017; MERO; CAMPISI, 2014; SANDRI *et al.*, 2004). Dessa forma, sistemas de liberação de fármacos baseados em HA podem garantir um maior tempo de residência da formulação na mucosa, aumentando o tempo para que ocorra ação local ou absorção sistêmica do fármaco.

## REFERÊNCIAS

- ABOUDIAB, B.; TEHRANI-BAGHA, A. R.; PATRA, D. Curcumin degradation kinetics in micellar solutions: Enhanced stability in the presence of cationic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.l.], v. 592, May 2020.124602 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775720301953>. Acesso em 20 jul. 2021.
- AGATHOKLEOUS, E.; KITAO, M.; CALABRESE, E. J. New insights into the role of melatonin in plants and animals. **Chemico-Biological Interactions**, [S.l.], v. 299, p. 163–167, Feb. 2019.
- AGGARWAL, B.; BHARTI, A. C. Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. **Anticancer Research**, [S.l.], v. 398, n. 1A, p. 363–398, Jan./Feb. 2003.
- ALI, A. *et al.* Will a water gradient in oral mucosa affect transbuccal drug absorption? **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S.l.], v. 48, p. 338–345, Dec. 2018.
- ALOK, A. *et al.* Curcumin: Pharmacological actions and its role in head and neck squamous cell carcinoma - A review. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine & Radiology**, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 115–118, Apr./Jun. 2017.
- ANAYA, M. V. *et al.* Quality assessment of clinical practice guidelines on treatments for oral cancer. **Cancer Treatment Reviews**, [S.l.], v. 65, n. 29, p. 47–53, Apr. 2018.
- ANDRADE, J. O. M.; SANTOS, C. A. DE S. T.; OLIVEIRA, M. C. Fatores associados ao câncer de boca: um estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.l.], v. 18, n. 4, p. 894–905, out/dez. 2015.
- ARAYA, C. Diagnóstico Precoz Y Prevención En Cáncer De Cavidad Oral. **Revista Médica Clínica Las Condes**, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 411–418, Jul./Ago. 2018.
- ARDITO, F. *et al.* Effects of Curcumin on Squamous Cell Carcinoma of Tongue: An In Vitro Study. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 233–243, 2018.
- ARMIJO, P. *et al.* Ação da melatonina no tecido cartilaginoso. **Reprodução & Climatério**, [S.l.], v. 28, n. 1, p. 24–29, Jan.-Apr. 2013.
- ASGHARI, M. H. *et al.* Does the use of melatonin overcome drug resistance in cancer chemotherapy? **Life Sciences**, [S.l.], v. 196, p. 143–155, Mar. 2018.
- ASWATHANARAYAN, J. B.; VITTAL, R. R. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, [S.l.], v. 3, p. 1–21, Nov. 2019.
- AZMI, N. A. N. *et al.* Nanoemulsions: Factory for food, pharmaceutical and cosmetics. **Processes**, [S.l.], v. 7, n. 9, p. 1–34, Sep. 2019.
- BACHMEIER, B. E.; KILLIAN, P. H.; MELCHART, D. The Role of Curcumin in Prevention and Management of Metastatic Disease. **International Journal of Molecular Sciences Review**, [S.l.], v. 19, n. 6, Jun. 2018. ID 1716. Disponível em:

file:///C:/Users/User/Downloads/The\_Role\_of\_Curcumin\_in\_Prevention\_and\_Management\_.pdf. Acesso em 02 ago. 2021.

BARTKOWIAK, A. *et al.* Surface properties and morphology of selected polymers and their blends designed to mucoadhesive dosage forms. **Reactive and Functional Polymers**, v. 118, p. 10–19, Sep. 2017.

BATRA, H.; PAWAR, S.; BAHL, D. Curcumin in combination with anti-Cancer Drugs: A nanomedicine review. **Pharmacological Research**, [S.l.], v. 139, p. 91–105, Jan. 2018.

BISHAYEE, A. Natural Products for Cancer Prevention and Therapy: Progress, Pitfalls and Promise. *In*: YERER, M. B.; BISHAYEE, A. **International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy**, 2, 2017, Kaysery, Turkey. Proceedings, Basel, Switzerland: MDPI, 2017, p. 982.

BOBADE, N. N. *et al.* A review on buccal drug delivery system. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 35–40, 2013.

BORGES, G. Á. *et al.* In vivo and in vitro effects of curcumin on head and neck carcinoma: a systematic review. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, [S.l.], v. 46, n. 1, p. 3–20, Jan. 2017.

BOUCHEMAL, K. *et al.* Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification : solvent , oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 280, p. 241–251, Aug. 2004.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, Sep. 2018.

BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsions As Parenteral Drug Delivery Systems. **Química Nova**, [S.l.], v. 35, n. 9, p. 1827–1840, Jul. 2012.

BUKHARI, S. N. A. *et al.* Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 120, p. 1682–1695, Dec. 2018.

CAI, J. *et al.* A potential carrier for anti-tumor targeted delivery-hyaluronic acid nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 208, p. 356–364, Mar. 2019.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotechnology in medicine: concepts and concerns. **Química Nova**, [S.l.], v. 37, n. 3, p. 521–526, Jun. 2014.

CARPENTIERI, A. R. *et al.* Melatonin and periodontal tissues: Molecular and clinical perspectives. **Pharmacological Research**, [S.l.], v. 125, p. 224–231, Nov. 2017.

CARVALHO, F. C. *et al.* Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 46, n. 1, p. 1–17, Jan./Mar. 2010.

CAS, M. D.; GHIDONI, R. Dietary curcumin: Correlation between bioavailability and health potential. **Nutrients**, v. 11, n. 9, Sep. 2019. 2147. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6770259/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

CASTER, J. M. *et al.* Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. **WIREs Nanomedicine and**

**Nanobiotechnology**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 1–18, Jan./Feb. 2017.

CHAKRAVARTI, N.; MYERS, J. N.; AGGARWAL, B. B. Targeting constitutive and interleukin-6-inducible signal transducers and activators of transcription 3 pathway in head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin (diferuloylmethane).

**International Journal of Cancer**, [S.l.], v. 119, n. 6, p. 1268–1275, Sep. 2006.

CHATTERJEE, B. *et al.* Mucoadhesive polymers and their mode of action: A recent update. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 5, p. 195–203, May 2017.

CHEN, C. *et al.* The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. **Journal of Hematology and Oncology**, [S.l.], v. 11, n. 1, May 2018a. ID 64. Disponível em:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946470/pdf/13045\\_2018\\_Article\\_605.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946470/pdf/13045_2018_Article_605.pdf). Acesso em 21 jul. 2021.

CHEN, C.-F. *et al.* Synergistic inhibitory effects of cetuximab and curcumin on human cisplatin-resistant oral cancer CAR cells through intrinsic apoptotic process. **Oncology Letters**, [S.l.], v. 16, n. 5, p. 6323–6330, Nov. 2018b.

COHEN, N.; FEDEWA, S.; CHEN, A. Y. Epidemiology and demographics of the head and neck cancer population. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [S.l.], v. 30, n. 4, p. 381–395, Nov. 2018.

COLLINO, L. **Curcumina: de Especiaria à Nutracêutico**. 2014. 88f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2014. Disponível em:

<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/124230/000833289.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25 fev. 2020.

COLOMBO, J.; RAHAL, P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S.l.], v. 55, n. 2, p. 165–174, Jun. 2009.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. **Medical Principles and Practice**, [S.l.], v. 25, suppl. 2, p. 41–59, Dec. 2016.

CRUZ, A. K. D.; VAISH, R.; DHAR, H. Oral cancers: Current status. **Oral Oncology**, [S.l.], v. 87, p. 64–69, Dec. 2018.

CUTANDO, A. *et al.* Role of melatonin in cancer treatment. **Anticancer Research**, [S.l.], v. 32, n. 7, p. 2747–2754, Jul. 2012.

CUTANDO, A. *et al.* Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. **Odontology**, [S.l.], v. 102, p. 290–296, 2014.

D'SOUZA, S.; ADDEPALLI, V. Preventive measures in oral cancer: An overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 107, p. 72–80, Nov. 2018.

DeMURO, R. L.; NAFZIGER, A. N.; BLASK, D. E. The Absolute Bioavailability of Oral Melatonin. **The Journal of Clinical Pharmacology**, [S.l.], v. 40, n. 7, p. 781–784, Jul. 2000.

DEY, A. *et al.* Investigating behaviour of polymers in nanoparticles of Chitosan

Oligosaccharides coated with Hyaluronic Acid. **Polymer**, [S.l.], v. 93, p. 44–52, Jun. 2016.

DIN, F. *et al.* Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 12, p. 7291-7309, Oct. 2017.

DHILLON, N. *et al.* Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, [S.l.], v. 14, n. 14, p. 4491–4499, Jul. 2008.

ELZOGHBY, A. O. *et al.* Superiority of aromatase inhibitor and cyclooxygenase-2 inhibitor combined delivery: Hyaluronate-targeted versus PEGylated protamine nanocapsules for breast cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 529, n. 1–2, p. 178–192, Aug. 2017.

ETMAN, S. M. *et al.* Lactoferrin/Hyaluronic acid double-coated lignosulfonate nanoparticles of quinacrine as a controlled release biodegradable nanomedicine targeting pancreatic cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 578, p. 1–15, Mar. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517320300818?via%3Dihub>. Acesso em: 06 set 2021.

ETTINGER, K.; GANRY, L; FERNANDES, R. Oral Cavity Cancer. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 13–29, Feb. 2019.

FADUS, M. C. *et al.* Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [S.l.], v. 7, n. 3, p. 339–346, Sep. 2017.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 63, n. 3, p. 136–151, Mar. 2011.

FAVERO, G. *et al.* Melatonin and its atheroprotective effects: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S.l.], v. 382, n. 2, p. 926–937, Feb. 2014.

FELLER, L.; LEMMER, J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **Journal of Cancer Therapy**, [S.l.], v. 3, n. 4, p. 263–268, Aug. 2012.

FERNANDEZ-GIL, B. I. *et al.* Melatonin Enhances Cisplatin and Radiation Cytotoxicity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Stimulating. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S.l.], v. 2019, Feb. 2019. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/omcl/2019/7187128.pdf>. Acesso em: 12 Jul. 2021.

FERLAY, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, [S.l.], v. 144, n. 8, p. 1941–1953, Dec. 2019.

FILALI, S. *et al.* Formulation, stability testing, and analytical characterization of melatonin-based preparation for clinical trial. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 237, Aug. 2017.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. An overview of polymeric dosage forms in



- buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. **Materials Science and Engineering C**, [S.l.], v. 86, p. 129–143, May 2018.
- FRANCISCO, A. L. N. *et al.* Analysis of surgical margins in oral cancer using in situ fluorescence spectroscopy. **Oral Oncology**, [S.l.], v. 50, n. 6, p. 593–599, Jun. 2014.
- FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polimeros**, [S.l.], v. 25, p. 1–9, Dez. 2015.
- GARRIDO, M.; TERRÓN, M. P.; RODRÍGUEZ, A. B. Chrononutrition against oxidative stress in aging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703798/>. Acesso em 06 set. 2021
- GKOUVERIS, I.; NIKITAKES, N.; SKLAVOUNOU, A. P38 expression and modulation of Stat3 signaling oral cancer. **Pathology & Oncology Research**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 183–192, Jan. 2020.
- GLENNY, A.-M. *et al.* Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: radiotherapy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S.l.], v. 8, n. 9, Sep. 2010. CD006386. Disponível em: [https://core.ac.uk/reader/20451337?utm\\_source=linkout](https://core.ac.uk/reader/20451337?utm_source=linkout). Acesso em 20 jul. 2021.
- GOLOMBEK, S. K. *et al.* Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 130, p. 17–38, May 2018.
- GONÇALVES, N. N. *et al.* Molecular markers of angiogenesis and metastasis in lines of oral carcinoma after treatment with melatonin. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 14, n. 9, p. 1302–1311, 2014.
- GOONERATNE, N. S. *et al.* Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge- sustained release doses in older adults. **Journal of Pineal Research**, [S.l.], v. 52, n. 4, p. 437–445, May 2012.
- GORADEL, N. H. *et al.* Melatonin as an angiogenesis inhibitor to combat cancer: Mechanistic evidence. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S.l.], v. 335, p. 56–63, Nov. 2017.
- GOSWAMI, T.; JASTI, B. R.; LI, X. Sublingual drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, [S.l.], v. 25, n. 5, p. 449–484, 2008.
- GOTOV, O. *et al.* Hyaluronic acid-coated cisplatin conjugated gold nanoparticles for combined cancer treatment. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [S.l.], v. 65, p. 236–243, Sep. 2018.
- GUPTA, A. *et al.* Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, [S.l.], v. 12, n. 11, p. 2826–2841, Mar. 2016.
- HAJAM, Y. A. *et al.* Combined administration of exogenous melatonin and insulin ameliorates streptozotocin induced toxic alteration on hematological parameters in diabetic male Wistar rats. **Toxicology Reports**, [S.l.], v. 7, p. 353–359, Feb. 2020.
- HARDELAND, R. Melatonin in Plants – Diversity of Levels and Multiplicity of Functions. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 7, Feb. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4759497/pdf/fpls-07-00198.pdf>. Acesso em 06 sep. 2021.

- HARPSOE, N. G. *et al.* Clinical pharmacokinetics of melatonin: A systematic review. **European Journal of Clinical Pharmacology**, [S.l.], v. 71, n. 8, p. 901–909, Aug. 2015.
- HEARNDEN, V. *et al.* New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 64, n. 1, p. 16–28, Jan. 2012.
- HELGESON, M. E. Colloidal behavior of nanoemulsions: Interactions, structure, and rheology. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, [S.l.], v. 25, p. 39–50, Oct. 2016.
- HU, A. *et al.* Curcumin as therapeutics for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma by activating SIRT1. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 5, n. 13429, p. 1–14, Aug. 2015.
- HUANG, G.; CHEN, J. Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 125, p. 478–484, Mar. 2019.
- HUSSAIN, Z. *et al.* Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives. **Materials Science and Engineering C**, [S.l.], v. 77, p. 1316–1326, Aug. 2017.
- INCA. **Tipos de câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca>>.
- JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 123–127, Apr. 2015.
- JAMWAL, R. Bioavailable curcumin formulations: A review of pharmacokinetic studies in healthy volunteers. **Journal of integrative medicine**, [S.l.], v. 16, n. 6, p. 367–374, Nov. 2018.
- JANKUN, J. *et al.* Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, [S.l.], v. 37, n. 5, p. 1151–1158, May 2016.
- JIANG, T.; LIAO, W.; CHARCOSSET, C. Recent advances in encapsulation of curcumin in nanoemulsions: A review of encapsulation technologies, bioaccessibility and applications. **Food Research International**, [S.l.], v. 132, Jun. 2020. ID 109035. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920300600>. Acesso em 20 jul 2021.
- JOHNS, J. Estimation of melatonin blood brain barrier permeability. **Journal of Bioanalysis and Biomedicine**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 64–69, Jan. 2011.
- JOHNSON, D. E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.l.], v. 6, n. 92, p. 1–22, Nov. 2020.
- JUNG, B.; AHMAD, N. Melatonin in cancer management: Progress and promise. **Cancer Research**, [S.l.], v. 66, n. 20, p. 9789–9793, Oct. 2006.
- KAIDAR-PERSON, O.; GIL, Z.; BILLAN, S. Precision medicine in head and neck cancer. **Drug Resistance Updates**, [S.l.], v. 40, p. 13–16, Sep. 2018.
- KALAM, M. A. Development of chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for

- topical ocular delivery of dexamethasone. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 89, p. 127–136, Aug. 2016.
- KALE, S.; DEORE, S. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion. **Systematic Review in Pharmacy**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 39–47, Nov. 2017.
- KAREEMAGHAY, S.; TAVASSOLI, M. Clinical immunotherapeutic approaches for the treatment of head and neck cancer. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [S.l.], v. 48, n. 4, p. 419–436, Apr. 2018.
- KAUSHIK, K.; SHARMA, R. B.; AGARWAL, S. Natural polymers and their applications. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 37, n. 2, p. 30–36, Mar./Apr. 2016.
- KAZAZIS, C. *et al.* Curcumin and diabetes: Mechanisms of action and its anti-diabetic properties. **Current Topics in Nutraceutical Research**, [S.l.], v. 12, n. 4, p. 135–142, Nov. 2014.
- KHACHANE, P. V. *et al.* Cationic nanoemulsions as potential carriers for intracellular delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 2, p. 188–194, 2015.
- KHAFIF, A. *et al.* Curcumin: A potential radio-enhancer in head and neck cancer. **Laryngoscope**, [S.l.], v. 119, n. 10, p. 2019–2026, Oct. 2009.
- KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, [S.l.], v. 54, p. 1–17, Nov. 2017.
- KHAN, S. *et al.* Curcumin based nanomedicines as efficient nanoplatform for treatment of cancer: New developments in reversing cancer drug resistance, rapid internalization, and improved anticancer efficacy. **Trends in Food Science and Technology**, [S.l.], v. 80, p. 8–22, Jul. 2018.
- KHAZIR, J. *et al.* Anticancer agents from diverse natural sources. **Natural Product Communications**, [S.l.], v. 9, n. 11, p. 1655–1669, Nov. 2014.
- KIKWAI, L. *et al.* Effect of vehicles on the transdermal delivery of melatonin across porcine skin in vitro. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 83, n. 2, p. 307–311, Oct. 2002.
- KIM, H. *et al.* Hyaluronate and its derivatives for customized biomedical applications. **Biomaterials**, [S.l.], v. 123, p. 155–171, Apr. 2017.
- KIM, H. *et al.* Multifunctional hyaluronate – nanoparticle hybrid systems for diagnostic , therapeutic and theranostic applications. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 303, p. 55–66, Jun. 2019a.
- KIM, K. *et al.* Hyaluronic acid-coated nanomedicine for targeted cancer therapy. **Pharmaceutics**, [S.l.], v. 11, n. 7, p. 1–22, Jun. 2019b.
- KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], v. 146, p. 122–128, Feb. 2015.
- KOSTOGLU-ATHANASSIOU, I. Therapeutic applications of melatonin. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 13–24, Feb. 2013.
- KOURNIATIS, L. R. *et al.* Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Química Nova**, [S.l.], v. 33, n. 2, p. 295–300, Jan.

2010.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Melatonin and Circadian Rhythm: Aging, Cancer, and Mechanism. **Open Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 7, p. 545–560, 2014. Disponível em: [https://www.scirp.org/html/5-1340326\\_48230.htm](https://www.scirp.org/html/5-1340326_48230.htm). Acesso em 06 set 2021.

KRAAN, H. *et al.* Buccal and sublingual vaccine delivery. **Journal of Controlled Release, [S.l.]**, v. 190, p. 580–592, Sep. 2014.

KRÜGER, M. *et al.* Case Report The Correlation between Chronic Periodontitis and Oral Cancer. **Case Reports in Dentistry**, 2013. Article ID 262410. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3725788/pdf/CRIM.DENTISTRY2013-262410.pdf>. Acesso em 20 Julho 2021.

KUBATKA, P. *et al.* Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology, [S.l.]**, v. 122, p. 133–143, Feb. 2018.

KUMAR, M. *et al.* Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. **Preventive Nutrition and Food Science, [S.l.]**, v. 24, n. 3, p. 225–234, Sep. 2019.

KURIEN, B.; MATSUMOTO, H.; SCOFIELD, R. H. Nutraceutical value of pure curcumin. **Pharmacognosy Magazine, [S.l.]**, v. 13 (Suppl. 1), p. S161–S163, Jan. 2017.

LAM, J. K. W. *et al.* Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. **Advanced Drug Delivery Reviews, [S.l.]**, v. 73, p. 50–62, Jun. 2014.

LE CAMPION, A. C. O. V. *et al.* Caracterização do atraso no diagnóstico do câncer de boca e orofaringe em dois centros de referência. **Cadernos Saúde Coletiva, Rio de Janeiro**, v. 24, n. 2, p. 178–184, abr./jun. 2016.

LEE, B. J. *et al.* Solubility and stability of melatonin in propylene glycol and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin vehicles. **Archives of Pharmacal Research, [S.l.]**, v. 20, n. 6, p. 560–565, Dec. 1997.

LEE, S. E. *et al.* Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles to overcome drug-resistance in tumor cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology, [S.l.]**, v. 50, p. 365–371, Apr. 2019.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, [S.l.]**, v. 58, n. 2, p. 327–341, Sep. 2004.

LI, Y. *et al.* Melatonin for the prevention and treatment of cancer. **Oncotarget, [S.l.]**, v. 8, n. 24, p. 39896–39921, Jun. 2017a.

LI, Y. *et al.* Melatonin-loaded silica coated with hydroxypropyl methylcellulose phthalate for enhanced oral bioavailability: Preparation, and in vitro-in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, [S.l.]**, v. 112, p. 58–66, Mar. 2017b.

LI, Y. *et al.* Preparation, characterization and *in vitro* evaluation of melatonin-loaded porous starch for enhanced bioavailability. **Carbohydrate Polymers, [S.l.]**, v. 202, p. 125–133, Dec. 2018.

LISSONI, P. *et al.* Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients

- treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: A randomized trial. **Journal of Pineal Research**, [S.l.], v. 35, n. 1, p. 12–15, Aug. 2003.
- LIU, S.; MADU, C. O.; LU, Y. The Role of Melatonin in Cancer Development. **Oncomedicine**, [S.l.], v. 3, p. 37–47, May 2018.
- LOPRESTI, A. L. The problem of curcumin and its bioavailability: Could its gastrointestinal influence contribute to its overall health-enhancing effects? **Advances in Nutrition**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 41–50, Jan. 2018.
- LOTEMPIO, M. M. *et al.* Curcumin Suppresses Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Therapy : Preclinical**, [S.l.], v. 11, n. 19, p. 6994–7003, Oct. 2005.
- LUBEK, J. E. Head and Neck Cancer Research and Support Foundations. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [S.l.], v. 30, n. 4, p. 459–469, Nov. 2018.
- LUDWIG, N. *et al.* CD44(+) tumor cells promote early angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, [S.l.], v. 467, p. 85–95, Dec. 2019.
- LUO, Y.; PRESTWICH, G. D. Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. **Bioconjugate Chemistry**, [S.l.], v. 10, n. 5, p. 755–763, Sep./Oct. 1999.
- MAGANHIN, C. C. *et al.* Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: Breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S.l.], v. 54, n. 3, p. 267–271, Jun. 2008.
- MAHMOOD, K. *et al.* Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 81, p. 877–890, Nov. 2015.
- MAIOLINO, S. *et al.* Biodegradable nanoparticles sequentially decorated with polyethyleneimine and hyaluronan for the targeted delivery of docetaxel to airway cancer cells. **Journal of Nanobiotechnology**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 1–13, Apr. 2015.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 87–93, Feb. 2001.
- MARCAZZAN, S. *et al.* Nanomedicine, an emerging therapeutic strategy for oral cancer therapy. **Oral Oncology**, [S.l.], v. 76, p. 1–7, Jan. 2018.
- MARCHI, J. P. *et al.* Curcuma Longa L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 20, n. 3, p. 189–194, set./dez. 2016.
- MASON, T. G. *et al.* Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics Condensed Matter**, [S.l.], v. 18, n. 41, p. 635–666, Sep. 2006.
- MASUELLI, L. *et al.* Resveratrol potentiates the in vitro and in vivo anti-tumoral effects of curcumin in head and neck carcinomas. **Oncotarget**, [S.l.], v. 5, n. 21, p. 10745–10762, Nov. 2014.
- MATTHEOLABAKIS, G. *et al.* Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: From receptor biology to nanomedicine. **Journal of Drug Targeting**, [S.l.], v. 23, n. 7–8, p. 605–618, 2015.
- MAZZARINO, L. *et al.* Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with

- curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S.l.], v. 370, n. 1, p. 58–66, Mar. 2012.
- MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, [S.l.], v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 2011.
- MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, [S.l.], v. 8, n. 6, p. 1719, 2012.
- MEHTA, A.; KAUR, G. Potential role of melatonin in prevention and treatment of oral carcinoma. **Indian Journal of Dentistry**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 56–61, Apr. 2014.
- MELO, C. M. *et al.* Amphotericin B-loaded Eudragit RL100 nanoparticles coated with hyaluronic acid for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, n. 115608, p. 1–12, 2020.
- MENDENHALL, W. M. *et al.* Radiation Oncology for Head and Neck Cancer. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 31–38, Feb. 2018.
- MERO, A.; CAMPISI, M. Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules. **Polymers**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 346–369, Jan. 2014.
- MIRZA, A. Z.; SIDDIQUI, F. A. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. **International Nano Letters**, [S.l.], v. 4, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s40089-014-0094-7.pdf>. Acesso em: 06 set 2021.
- MOHANRAJ, V.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 561–573, 2006.
- MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the Oral Cavity. **Surgical Oncology Clinics of North America**, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 491–508, Jul. 2015.
- MORALES, J. O.; BRAYDEN, D. J. Buccal delivery of small molecules and biologics: of mucoadhesive polymers, films, and nanoparticles. **Current Opinion in Pharmacology**, [S.l.], v. 36, p. 22–28, Oct. 2017.
- MORO, J. DA S. *et al.* Oral and oropharyngeal cancer: epidemiology and survival analysis. **Einstein**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 1–5, 2018.
- MUHAMAD, N.; PLENGSURIYAKARN, T.; NA-BANGCHANG, K. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: A systematic review. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 13, p. 3921–3935, Jul. 2018.
- NAJAFI, M. *et al.* Adjuvant chemotherapy with melatonin for targeting human cancers: A review. **Journal of Cellular Physiology**, [S.l.], v. 234, n. 3, p. 2356–2372, Mar. 2019.
- NAJEEB, S. *et al.* Therapeutic potential of melatonin in oral medicine and periodontology. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, [S.l.], v. 32, n. 8, p. 391–396, Aug. 2016.
- NAKSURIYA, O. *et al.* Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. **Biomaterials**, [S.l.], v. 35, n. 10, p. 3365–3383, Mar. 2014.
- NAKSURIYA, O. *et al.* A Kinetic Degradation Study of Curcumin in Its Free Form and

Loaded in Polymeric Micelles. **The AAPS Journal**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 777–787, May 2016.

OH, S. Y. *et al.* CD44-negative cells in head and neck squamous carcinoma also have stem-cell like traits. **European Journal of Cancer**, [S.l.], v. 49, n. 1, p. 272–280, Jan. 2013.

OLIVEIRA, L. C. *et al.* Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S.l.], v. 58, n. 4, p. 695–701, Oct./Nov./Dec. 2012.

OMAR, E. A. The Outline of Prognosis and New Advances in Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC): Review of the Literature. **Journal of Oral Oncology**, 2013. Article ID 519312. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/archive/2013/519312.pdf>. Acesso em 21 jul. 2021.

OYARZUN-AMPUERO, F. A. *et al.* Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 49, p. 483–490, Jul. 2013.

PAI, S. I.; WESTRA, W. H. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. **Annual Review of Pathology**, [S.l.], n. 4, p. 49–70, Jul. 2009.

PAN, N. C. *et al.* Hyaluronic acid: characteristics, microbial production and industrial applications. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, [S.l.], v. 2, n. 4, p. 42, Jul./Dez. 2013.

PANDA, A. K. *et al.* New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. **Journal of Experimental Pharmacology**, [S.l.], v. 9, p. 31–45, Mar. 2017.

PAOLINO, D. *et al.* Improvement of Oral Bioavailability of Curcumin upon Microencapsulation with Methacrylic Copolymers. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 2016. ID 485. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5174134/pdf/fphar-07-00485.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2021.

PARASHAR, P. *et al.* Hyaluronic acid decorated naringenin nanoparticles: Appraisal of chemopreventive and curative potential for lung cancer. **Pharmaceutics**, v. 10, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874846/pdf/pharmaceutics-10-00033.pdf>. Acesso em 06 set 2021.

PARIZI, A. C. G. *et al.* A comparison between the concentration of mast cells in squamous cell carcinomas of the skin and oral cavity. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.l.], v. 85, n. 6, p. 811–818, Dec. 2010.

PARTENHAUSER, A.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Mucoadhesive polymers in the treatment of dry X syndrome. **Drug Discovery Today**, [S.l.], v. 21, n. 7, p. 1051–1062, Jul. 2016.

PATHER, S. I.; RATHBONE, M. J.; ŞENEL, S. Current status and the future of buccal drug delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S.l.], v. 5, n. 5, p. 531–542, May 2008.

PAVONI, L. *et al.* An overview of micro-and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. **Nanomaterials**, [S.l.], v. 10, Jan. 2020.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7023169/pdf/nanomaterials-10-00135.pdf>. Acesso em: 06 set. 2021.

PENGON, S. *et al.* The effect of surfactant on the physical properties of coconut oil nanoemulsions. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 5, p. 409–414, Sep. 2018.

PEREIRA, A. C. *et al.* O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S.l.], v. 52, n. 3, p. 257–262, jul./set. 2006.

PEVET, P.; KLOSEN, P.; FELDER-SCHMITTBUHL, M. P. The hormone melatonin: Animal studies. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S.l.], v. 31, n. 6, p. 547–559, Dec. 2017.

KOMNINOU *et al.* Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **Plos One**, [S.l.], v. 11, n. 6, e0157561, Jun. 2016. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4910990/pdf/pone.0157561.pdf>. Acesso em 12 Jul. 2021.

POLYCHNIATOU, V.; TZIA, C. Study of formulation and stability of co-surfactant free water-in-olive oil nano- and submicron emulsions with food grade non-ionic surfactants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [S.l.], v. 91, n. 1, p. 79–88, Oct. 2014.

PRADHAN, R. *et al.* Hyaluronic acid-decorated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for combined delivery of docetaxel and tanespimycin. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 123, p. 313–323, Jun. 2015.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice. **Cancer Research and Treatment**, [S.l.], v. 46, n. 1, p. 2–18, Jan. 2014.

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

PROIETTI, S. *et al.* Soft gel capsules improve melatonin's bioavailability in humans. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, [S.l.], v. 10, n. 9, p. 1193–1198, Sep. 2014.

PURATCHIKODY, A. *et al.* Buccal Drug Delivery: Past, Present and Future – A Review. **International Journal of Drug Delivery**, [S.l.], v. 3, p. 171–184, 2011.

RAI, V. K. *et al.* Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 270, p. 203–225, Jan. 2018.

RAJESH, E. *et al.* Naturally occurring products in cancer therapy. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, [S.l.], v. 7, suppl.1, p. S181-S183, Apr. 2015..

RIBEIRO, I. L. A. *et al.* Predictors for oral cancer in Brazil. **Revista de Odontologia da UNESP**, [S.l.], v. 46, n. 6, p. 325–329, Nov./Dez. 2017.

RODRIGUES, F. V. S. *et al.* Preparation and characterization of nanoemulsion containing a natural naphthoquinone. **Quimica Nova**, [S.l.], v. 41, n. 7, p. 756–761, Jul.



2018.

ROSSI, S.; SANDRI, G.; CAMELLA, C. M. Buccal drug delivery: A challenge already won? **Drug Discovery Today: Technologies**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 59–65, 2005.

RUSSO, E. *et al.* A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S.l.], v. 32, p. 113–125, Apr. 2016.

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y. C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. **Materials Today: Proceedings**, [S.l.], v. 27, n. 454-459, 2019.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 57, n. 11, p. 1666–1691, Nov. 2005.

SALEHI, B. *et al.* The therapeutic potential of curcumin: A review of clinical trials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 163, p. 527-545, Feb. 2019.

SÁNCHEZ, A.; CALPENA, A. C.; CLARES, B. Evaluating the oxidative stress in inflammation: Role of melatonin. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 16, n. 8, p. 16981–17004, Jul. 2015.

SANDRI, G. *et al.* Mucoadhesive and penetration enhancement properties of three grades of hyaluronic acid using porcine buccal and vaginal tissue, Caco-2 cell lines, and rat jejunum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S.l.], v. 56, n. 9, p. 1083–1090, Sep. 2004.

SANEJA, A. *et al.* CD44 targeted PLGA nanomedicines for cancer chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 121, p. 47–58, Aug. 2018.

SASIKUMAR, A.; KAMALASANAN, K. Nanomedicine for prostate cancer using nanoemulsion: A review. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 260, p. 111–123, Aug. 2017.

SATTAR, M.; SAYED, O. M.; LANE, M. E. Oral transmucosal drug delivery - Current status and future prospects. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 471, n. 1–2, p. 498–506, Aug. 2014.

SCHOLZ, O. A. *et al.* Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device. **Drug Discovery Today**, [S.l.], v. 13, n. 5–6, p. 247–253, Mar. 2008.

SCUTTI, J. A. B. *et al.* Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC): desvendando os mistérios do microambiente tumoral. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentista**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 156–163, Abr./Jun.2016.

SEBASTIAN, R. Nanomedicine - the Future of Cancer Treatment: A Review. **Journal of Cancer Prevention & Current Research**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 14-18, May 2017.

SHAH, R. *et al.* Insulin delivery methods: Past, present and future. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 1-9, Jan./Mar. 2016.

SHAKER, D. S. *et al.* Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica**, [S.l.], v. 87, n. 3, p. 1–34, Jul. 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-0532/87/3/17/htm>. Acesso em: 06 set 2021.

- SHEN, Y. Q. *et al.* Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: Suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation. **Journal of Pineal Research**, [S.l.], v. 64, n. 3, e12461, Jul. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jpi.12461>. Acesso em 12 Jul. 2021.
- SHEORAN, R. Buccal Drug Delivery System: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, [S.l.], v. 1, n. 50, p. 40–46, May 2018.
- SHI, X. L. *et al.* Delivery of MTH1 inhibitor (TH287) and MDR1 siRNA via hyaluronic acid-based mesoporous silica nanoparticles for oral cancers treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 173, p. 599–606, Jan. 2019.
- SHRESTHA, S. *et al.* Melatonin potentiates the antitumor effect of curcumin by inhibiting IKK $\kappa$ /NF- $\kappa$ B/COX-2 signaling pathway. **International Journal of Oncology**, [S.l.], v. 51, n. 4, p. 1249–1260, Oct. 2017.
- SILVA, B. M. A. *et al.* Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 494, n. 1, p. 537–551, Oct. 2015a.
- SILVA, J. D. F. DA *et al.* Microemulsions: Components, Characteristics, Potentialities in Food Chemistry and Other Applications. **Química Nova**, [S.l.], v. 38, n. 9, p. 1196–1206, Nov. 2015b.
- SIM, F.; LEIDNER, R.; BELL, R. B. Immunotherapy for Head and Neck Cancer. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [S.l.], v. 31, n. 1, p. 85–100, Feb. 2019.
- SINGH, Y. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 252, p. 28–49, Apr. 2017.
- SIVEEN, K. S. *et al.* Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.], v. 1845, n. 2, p. 136–154, Apr. 2014.
- SIVIERO, A. *et al.* Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 57–70, Jun. 2015.
- SOARES, T. B. *et al.* Lipid nanocarriers loaded with natural compounds: Potential new therapies for age related neurodegenerative diseases? **Progress in Neurobiology**, [S.l.], v. 168, p. 21–41, Sep. 2018.
- SOBHANI, H. *et al.* Formulation development and toxicity assessment of triacetin mediated nanoemulsions as novel delivery systems for rapamycin. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 14 (Suppl.), p. 3–21, 2015.
- SRINIVASAN, V. *et al.* Agomelatine in depressive disorders: Its novel mechanisms of action. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 290–308, 2012.
- SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 114, n. 1, p. 15–40, Aug. 2006.
- SUETH-SANTIAGO, V. *et al.* Curcumina, o pó dourado do açafreão-da-terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, [S.l.], v. 38, n. 4, p. 538–552, Maio 2015.

- SUNAGAWA, Y. *et al.* Clinical applications of curcumin. **PharmaNutrition**, [S.l.] v. 3, n. 4, p. 131–135, Oct. 2015.
- SUTRADHAR, K. B.; AMIN, M. L. Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting. **ISRN Nanotechnology**, [S.l.], v. 2014, 2014. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/archive/2014/939378.pdf>. Acesso em 06 set 2021.
- TEIXEIRA, H. F. *et al.* Cationic nanoemulsions as nucleic acids delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 534, n. 1–2, p. 356–367, Dec. 2017.
- TINOCO, L. M. *et al.* Hyaluronic acid-coated nanoemulsions loaded with a hydrophobic ion pair of all-trans retinoic acid for improving the anticancer activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 54, n. 4, p. 1–10, Jan. 2018.
- TIWARI, S.; BAHADUR, P. Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 121, p. 556–571, Jan. 2019.
- TODEN, S.; GOEL, A. The Holy Grail of Curcumin and its Efficacy in Various Diseases: Is Bioavailability Truly a Big Concern? **Journal of Restorative Medicine**, [S.l.], v. 6, p. 27–36, Dec. 2017.
- TORDJMAN, S. *et al.* Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. **Current Neuropharmacology**, [S.l.], v. 15, p. 434–443, Apr. 2017.
- TRAN, S. *et al.* Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 44, Dec. 2017.
- TUCCI, R.; HENRIQUE, P.; CASTRO, S. Avaliação de 14 casos de carcinoma epidermoide de boca com diagnóstico tardio Evaluation of 14 cases of oral squamous cell carcinoma with delayed diagnosis. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 231–238, Jun. 2009.
- VANGARA, K. K.; LIU, J. L.; PALAKURTHI, S. Hyaluronic Acid-decorated PLGA-PEG Nanoparticles for Targeted Delivery of SN-38 to Ovarian Cancer. **Anticancer Research**, [S.l.], v. 33, p. 2425–2434, Jun. 2013.
- VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 99–103, Jan./Mar. 2016.
- WAN, K. *et al.* Novel nanoemulsion based lipid nanosystems for favorable in vitro and in vivo characteristics of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 504, n. 1–2, p. 80–88, May 2016.
- WANG, D. *et al.* Liposome-encapsulated curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in xenografts through the inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B by an AKT-independent pathway. **Clinical Cancer Research**, [S.l.], v. 14, n. 19, p. 6228–6236, Oct. 2008.
- WANG, Y. *et al.* Current Hydrogel Solutions for Repairing and Regeneration of Complex Tissues. **Current Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 21, n. 22, p. 2480–2496, 2014.
- WANG, Y.; ZHAO, R.; GOLDMAN, I. D. Decreased expression of the reduced folate carrier and folypolyglutamate synthetase is the basis for acquired resistance to the pemetrexed antifolate (LY231514) in an L1210 murine leukemia cell line. **Biochemical Pharmacology**, [S.l.], v. 65, n. 7, p. 1163–1170, Apr. 2003.

- WICKENS, J. M. *et al.* Recent advances in hyaluronic acid-decorated nanocarriers for targeted cancer therapy. **Drug Discovery Today**, [S.l.], v. 22, n. 4, p. 665–680, Apr. 2017.
- WILKEN, R. *et al.* Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular Cancer**, [S.l.], v. 10, Feb. 2011. Disponível em: <http://https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3055228/pdf/1476-4598-10-12.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2021.
- WU, T. F. *et al.* CD44 + cancer cell-induced metastasis: A feasible neck metastasis model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 101, p. 243–250, Apr. 2017.
- XIAO, B. *et al.* Hyaluronic acid-functionalized polymeric nanoparticles for colon cancer-targeted combination chemotherapy. **Nanoscale**, [S.l.], v. 7, n. 42, p. 17745–17755, Nov. 2015.
- XIAO, B. *et al.* Orally Targeted Delivery of Tripeptide KPV via Hyaluronic Acid-Functionalized Nanoparticles Efficiently Alleviates Ulcerative Colitis. **Molecular Therapy**, [S.l.], v. 25, n. 7, p. 1628–1640, Jul. 2017.
- XIE, X. *et al.* Challenges and Opportunities from Basic Cancer Biology for Nanomedicine for Targeted Drug Delivery. **Current Cancer Drug Targets**, [S.l.], v. 19, p. 257-276, 2019.
- YANG, C.-Y. *et al.* Melatonin exerts anti-oral cancer effect via suppressing LSD1 in patient-derived tumor xenograft models. **Oncotarget**, [S.l.], v. 8, n. 20, p. 33756–33769, May 2017.
- YANG, X. *et al.* Immobilization of Pseudorabies Virus in Porcine Tracheal Respiratory Mucus Revealed by Single Particle Tracking. **Plos One**, [S.l.], v. 7, n. 12, p. 51054, Dec. 2012.
- YANG, X. *et al.* Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer Letters**, [S.l.], v. 334, n. 2, p. 338–345, Jul. 2013.
- YEH, C.-M. *et al.* Melatonin inhibits TPA-induced oral cancer cell migration by suppressing matrix metalloproteinase-9 activation through the histone acetylation. **Oncotarget**, [S.l.], v. 7, n. 16, p. 21952–21967, Apr. 2016.
- YEH, C.-M. *et al.* Melatonin as a potential inhibitory agent in head and neck cancer. **Oncotarget**, [S.l.], v. 8, n. 52, p. 90545–90556, Aug. 2017.
- YENICE, I. *et al.* Hyaluronic acid coated poly-ε-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. **Experimental Eye Research**, [S.l.], v. 87, n. 3, p. 162–167, Sep. 2008.
- YETISGIN *et al.* Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. **Molecules**, [S.l.], v. 25, n. 9, May 2020. ID 2193. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248934/>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- YOUN, Y. S.; BAE, Y. H. Perspectives on the past, present, and future of cancer nanomedicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 130, p. 3–11, May 2018.
- YU, C. *et al.* Oral squamous cancer cell exploits hnRNP A1 to regulate cell cycle and proliferation. **Journal of Cellular Physiology**, [S.l.], v. 230, n. 9, p. 2252–2261, Sep. 2015.

ZANINI, M. *et al.* Carcinoma verrucoso: Uma variante clínico-histopatológica do carcinoma espinocelular. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.l.], v. 79, n. 5, p. 619–621, Out. 2004.

ZHANG, L. *et al.* Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [S.l.], v. 83, n. 5, p. 761–769, May 2008.

ZHEN, L. *et al.* Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion via EGFR signaling pathways. **International Journal of Clinical & Experimental Pathology**, [S.l.], v. 7, n. 10, p. 6438–6446, Sep. 2014.

ZHONG, L. *et al.* Exploring the relationship of hyaluronic acid molecular weight and active targeting efficiency for designing hyaluronic acid-modified nanoparticles. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 27, p. 521-530, Sep. 2018.

ZHOU, J. *et al.* Clinical and prognostic significance of HIF-1 $\alpha$  overexpression in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. **World Journal of Surgical Oncology**, [S.l.], v. 15, n. 1, May 2017. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5437521/pdf/12957\\_2017\\_Article\\_1163.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5437521/pdf/12957_2017_Article_1163.pdf). Acesso em 06 set 2021.

ZLOTOGORSKI, A. *et al.* Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer-I: Curcumin. **Oral Oncology**, [S.l.], v. 49, n. 3, p. 187–191, Mar. 2013.

ZORZI, G. K. *et al.* Biomateriais para formulações de base nanotecnológica visando terapia genética ocular. **Quim. Nova**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 74–84, Jan. 2017.



**CAPÍTULO I – APLICAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA  
QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE CURCUMINA E MELATONINA EM  
NANOEMULSÕES REVESTIDAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO**

---





A associação de fármacos em NC, tais como as NE, vem se tornando cada vez mais comum, especialmente para aqueles de reduzida hidrossolubilidade. Isso se deve principalmente a possibilidade de redução da toxicidade e aumento da biodisponibilidade. Em alguns casos ainda pode se atribuir uma liberação controlada e direcionada dos fármacos em sítios específicos, que podem ocorrer de forma passiva devido ao tamanho reduzido do sistema ou ativa pela adição de ligantes na superfície (BRUXEL *et al.*, 2012; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015).

A determinação quantitativa do fármaco incorporado nas NE geralmente é realizada por métodos analíticos que precisam ser adequadamente validados para garantir uma quantificação confiável do analito. Por se tratar de um sistema complexo o método deve ser sensível e seletivo o bastante para atender as exigências dos protocolos de controle de qualidade (CLAUSEN *et al.*, 2015; LINDNER; KHALIL; MAINARDES, 2013; SCHIBORR *et al.*, 2010). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) está entre as técnicas analíticas mais utilizadas para pesquisa de fármacos em sistemas biológicos e medicamentos. Devido à sua capacidade de detectar pequenas quantidades do analito também é eleita na quantificação de fármacos em sistemas nanoestruturados, apresentando alta seletividade, sensibilidade, repetibilidade e reprodutibilidade. Nessa técnica, os componentes de uma mistura são particionados entre um adsorvente (fase estacionária) e um solvente (fase móvel), sendo que essas fases variam de acordo com a características do analito de interesse e matriz em que ele está inserido (CLAUSEN *et al.*, 2015; DWIASTUTI *et al.*, 2018; TEKKELI; KIZILTAS, 2017). Os sistemas de detecção mais empregados na CLAE são o arranjo de fotodiodos (DAD) ou detector de ultravioleta-visível (UV-Vis), fluorescência, índice de refração, ressonância magnética nuclear, espectrômetro de massas e outros. Alguns fatores fundamentam a escolha do sistema a ser utilizado, entre eles a sensibilidade, seletividade, rapidez de resposta, linearidade e limite de detecção desejados (HESS, 2011; JESCHEK *et al.*, 2016).

Considerando que esse trabalho visa a obtenção de NE revestidas com HA contendo CUR e MEL se faz necessário a utilização de uma metodologia analítica capaz de quantificar os fármacos associados. Dessa forma, esse capítulo descreve na forma de manuscrito o processo de validação realizado por CLAE-DAD para determinação simultânea de CUR e MEL a partir de NE revestidas com HA, o qual foi publicado no *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, n.3, p. 467-475, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190205>.



*Manuscrito 1 – Application of a new validated HPLC-PDA method for simultaneous determination of curcumin and melatonin in hyaluronic acid-coated nanoemulsions*

---



**Application of a New Validated HPLC-PDA Method for Simultaneous  
Determination of Curcumin and Melatonin in Hyaluronic Acid-Coated  
Nanoemulsions**

*Edna da Silva Vieira, Elenara Lemos-Senna \**

*Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina,  
Brazil, Campus Trindade, 88040-970, Florianopolis, Brazil.*

**Abstract**

In this study, a HPLC-PDA method was developed and validated to simultaneously determine curcumin (CUR) and melatonin (MEL) in hyaluronic acid-coated nanoemulsions, a novel targetable delivery system to CD44 receptors overexpressed in many types of tumors. Chromatographic analyses were performed in reversed phase mode using a mobile phase consisting of acetonitrile, methanol and 0.1% formic acid (35:15:50, v/v/v) at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>, and detection at 223 and 425 nm. The method was successfully validated according the parameters of specificity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), inter/intra-day precision, accuracy, and robustness. Linearity was demonstrated in the CUR and MEL concentration range of 0.5-20.0 µg mL<sup>-1</sup> and 1.0-40.0 µg mL<sup>-1</sup> ( $r > 0.999$ ), respectively. Relative standard deviation (RSD) values for intra-day and inter-day precision were lower than 5%, and mean drug recovery varied from 94.91% to 98.33%. Mean drug content of 85.2 µg mL<sup>-1</sup> and 501.4 µg mL<sup>-1</sup> and entrapment efficiency of about 80% and 20% were obtained for CUR and MEL, respectively. These results may be correlated to the differences in the drug solubility of these drugs in the oil and water phases of the nanoemulsion.

**Keywords:** analytical validation, curcumin, melatonin, nanoemulsions, oral carcinoma

\* Corresponding author:

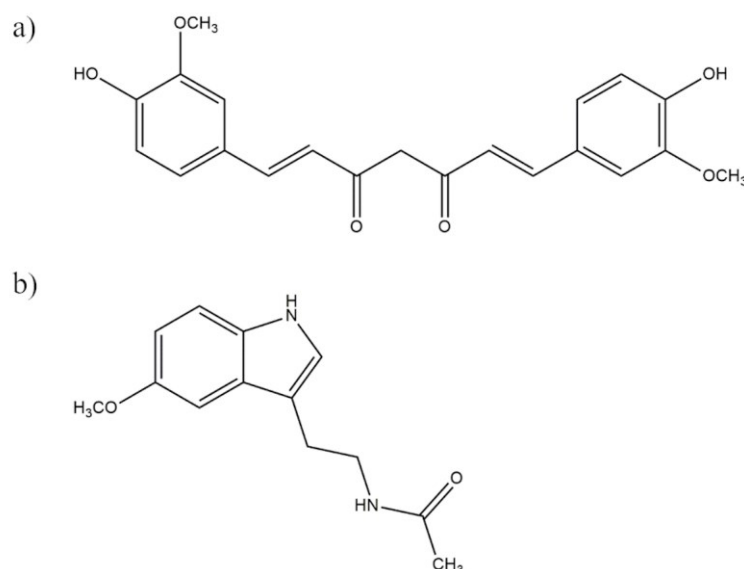
Email: lemos.senna@ufsc.br; ORCID id: <https://orcid.org/0000-0002-3642-4468>

## Introduction

Bioactive molecules extracted from diverse natural sources have been considered potential drug candidates for anticancer therapy. About 80% of drugs approved by the United States Food and Drug Administration during the last three decades for cancer therapy either are natural products per se or are based on, or mimicked natural products<sup>1,2</sup>. The anticancer and cancer preventive activity of natural products can be explained by multiple cellular and molecular mechanisms, for example, programmed cell death (apoptosis), alteration of cell cycles, anti-angiogenic and anti-inflammatory activity.<sup>1,3</sup>

Curcumin (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) (Figure 1.1a)<sup>4</sup> is a polyphenol derived from the plant *Curcuma longa* L., commonly called turmeric, which has been associated with antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antiviral, and antibacterial activities, as indicated by over 6.000 citations<sup>5-7</sup>. Several clinical trials dealing with cancers have addressed the pharmacokinetics, safety, and efficacy of CUR in humans.<sup>8</sup> Other natural-derived substance with anticancer activity is the indoleamine melatonin (N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide) (Figure 1.1b), which is synthesized in the pineal gland and is widely distributed in bacteria, unicellular organisms, algae, plants, invertebrates, and in many organs of vertebrates.<sup>4,9,10</sup> Melatonin (MEL) has a variety of biological properties including anti-inflammatory and antioxidant activity, as well as immune system regulator.<sup>11-15</sup> In cancer cells, MEL has the capacity to induce intracellular ROS, whose accumulation plays an upstream role in mitochondria-mediated apoptosis and autophagy. Moreover, can act more specifically on cancer cells, but not on normal cells, showing synergistic anticancer activity and reducing undesirable side effects in several chemotherapy regimens.<sup>11,14,15</sup>

Figure 1. 1. Chemical structure of (a) curcumin and (b) melatonin.



Several *in vitro* and *in vivo* studies describe the oncostatic properties for both CUR and MEL against squamous cell carcinoma and other tumors of the oral cavity, through several biological mechanisms, including antiproliferative functions, stimulation of anticancer immunity, modulation of the oncogene expression, and anti-oxidant, inflammatory, antimetastatic, and antiangiogenic effects.<sup>16-21</sup> However, delivering drugs in the oral cavity may be a challenging task, since drugs need to overcome the mechanical effects of the salivary washout that can quickly remove the dosage form from buccal epithelium. In this sense, the use of mucoadhesive nanocarriers has emerged as promising drug delivery systems for buccal administration, since they can interact with the mucus layer, extending contact time and increasing buccal bioavailability.<sup>22</sup> Besides the high drug carrier capability, nanocarriers can accumulate passively into tumor tissue due to its inherited enhanced permeability owed to the presence of larger endothelial fenestrations of the tumor vasculature that allow extravasation of the submicrometric particles.<sup>23</sup>

Considering the above mentioned, we have developed cationic nanoemulsions (NEs) co-encapsulating CUR and MEL intended to the treatment of the oral cavity cancers. Nanoemulsions (also known as miniemulsions) are kinetically stable emulsions with droplets size in the nanometric range. Nanosized droplets lead to improved solubility and bioavailability of drugs and they have the potential to target active molecules to particular tissues or sites. The NEs exhibit unique behavior due to their nanoscopic dimensions, including remarkable stability, droplet-droplet interactions, and rheological properties.<sup>24,25</sup> Besides, aiming to achieve the active targeting of the drugs towards tumor

cells, nanoemulsions were coated with hyaluronic acid (HA), a natural polysaccharide found in the extracellular matrix and synovial fluids of the body, that binds to specific cell receptor CD44, which is highly overexpressed in several cancers, including the oral carcinoma.<sup>26-29</sup>

The quantitative determination of the drug incorporated into NEs is usually performed by analytical methods that need to be adequately validated to ensure a reliable quantification of the analyte.<sup>30,31</sup> Literature on analysis of CUR revealed several methods based on different techniques, such as high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection, which have been used for its quantification in biological samples, and liquid chromatography-mass spectroscopy (LC/MS) for analysis in food products and plasma.<sup>32-34</sup> HPLC methods with UV detection were also used for determining CUR in biological fluids, liquid crystals, tablets and capsules, and liposomes.<sup>8,35-37</sup> Similarly, MEL determination in biological and pharmaceutical samples, such as nanoparticles, have been carried out by HPLC with fluorescence and UV detection.<sup>31,38-40</sup> It is important to consider that, depending on the method used for drug extraction, some components of the nanoemulsions can absorb in UV wavelength range, and thus, impair drug quantification. Moreover, no detailed reports of HPLC methods for simultaneous determination of CUR and MEL in NEs are described. Therefore, the present study aims to develop a simple, sensitive, accurate and reproducible method for simultaneous estimation of CUR and MEL in NEs by HPLC-PDA. The photodiode array detector (PDA) enables to analyze one or more wavelengths and is very efficient in confirming the peak purity of the several reported peak.<sup>41</sup>

## Materials

Castor oil, hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), hyaluronic acid (mol wt. 130-150 kDa), curcumin ( $\geq 94\%$  curcuminoid content,  $\geq 80\%$  Curcumin) and melatonin ( $\geq 98\%$  melatonin) were purchased from Sigma–Aldrich (USA). Hydrogenated soybean lecithin (Lipoid S100, 97.5% phosphatidylcholine) was purchased from Lipid Ingredients and Technologies (Brazil). Analytical grade acetone and ethanol were purchased from Neon Comercial (Brazil) and HPLC grade acetonitrile, methanol and formic acid from Honeywell International Inc (USA). Water utilized in the HPLC analyses was obtained using a Milli-Q purification system (Millipore, USA).



## Instrumentation and chromatographic conditions

The experiments were conducted using a Shimadzu HPLC system (Japan) equipped with a LC-20AD binary pump, a SIL-20AC HT auto-sampler, a CTO-20A forced air-circulation-type column oven, a SPD-M20 photo diode array UV/VIS detector, and a software LC Solution 1.2 (Shimadzu, Tokyo, Japan). The analyses were carried out in reversed phase mode using a Phenomenex<sup>®</sup> Luna C18 column (150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m; USA), equilibrated at 40 °C. Chromatographic analysis was performed on the isocratic mode with a mobile phase consisting of acetonitrile, methanol and 0.1% (v/v) formic acid aqueous solution (35:15:50; v/v/v), flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>, sample injection volume of 10  $\mu$ L, and detection at wavelengths of 223 nm and 425 nm for CUR and MEL, respectively. The run time was 8 minutes.

## Method validation

Validation of the analytical method was performed based on the International Conference on Harmonization and ANVISA guidelines, according to the following parameters: linearity, specificity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and robustness.<sup>42,43</sup>

Specificity was determined by comparing the representative chromatograms obtained for unloaded nanoemulsions and CUR-MEL-loaded nanoemulsions in order to verify the possible interference of the formulation constituents in the HPLC-PDA analysis. The system suitability of the HPLC method was verified by analyzing six replicate samples containing CUR (20.0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) and MEL (40.0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), using the developed method. The parameters of relative retention, repeatability, resolution between the CUR and MEL peaks, theoretical plates of the column, and tailing factor were checked.

The linearity of the method was verified through the calculation of the correlation coefficient ( $r$ ) of the analytical curves using the least squares method. The peak area was divided by the corresponding drug concentration and the resulting values were analyzed by the one-way analysis of variance (ANOVA) to confirm the validity of the linear regression ( $\alpha = 0,05$ ; 95% confidence). Homoscedasticity was assessed by

analysis of the residuals plots. The LOD and LOQ for CUR and MEL were calculated according the following equations:

$$LOD = \frac{3 \times \sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

Where  $\sigma$  is the standard deviation of y-axis interception values of the calibration curves and  $S$  is the angular coefficient of the calibration curve.

Repeatability (intra-day precision) of the method was assessed by testing three solutions of CUR and MEL, in three different levels: low (0.5 and 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), medium (4.0 and 8.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and high (20.0 and 40.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) on the same day. Intermediate precision (inter-day) was evaluated through the analysis of these solutions on three different days, in triplicate. Results were expressed as percent relative standard deviation (%RSD).

Accuracy of the method was assessed by the recovery test after spiking unloaded nanoemulsions with a CUR and MEL solution in order to obtain theoretical drug concentrations of three different levels: low (0.5 and 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), medium (4.0 and 8.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and high (20.0 and 40.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The analyses were performed in triplicate.

Robustness of the chromatographic method was evaluated by analysis of a CUR and MEL solution, both at concentration of 40.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , after small changes in the analytical parameters of column temperature (38 or 42 °C), flow rate (0.9  $\text{mL min}^{-1}$  or 1.1  $\text{min}^{-1}$ ), mobile phase composition (37:13:50 or 33:17:50; v/v/v), mobile phase pH (3.2 or 3.8), and wavelength detection (422/220 or 428/226 nm). The analyses were carried out in triplicate and the results were expressed in percentage of drug recovery and RSD.

### **Determination of CUR and MEL content and encapsulation efficiency in hyaluronic acid-coated nanoemulsion**

Firstly, a cationic nanoemulsion ( $\text{NE}_{\text{CUR/MEL}}$ ) was prepared by spontaneous emulsification, according to a previously described procedure.<sup>44</sup> The method consists of adding 400 mg of castor oil to an organic phase comprising 60 mg of lecithin, 0.5 mM of CTAB, 2 mg of CUR, and 10 mg of MEL previously dissolved in 20 mL of an ethanol and acetone (1:4, v/v) mixture. This organic phase was added to an aqueous phase (40

mL) under moderate magnetic stirring for 10 minutes. The formation of the cationic nanoemulsions was instantaneous, which was evident due to the milky appearance of the colloidal dispersion. Nanoemulsions were submitted to evaporation under reduced pressure to eliminate the organic solvents and concentration of the colloidal dispersions. Hyaluronic acid-coated nanoemulsion (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>) was prepared by adding 2 mg of HA in the aqueous phase, before nanoemulsion formation. Unloaded nanoemulsions were prepared using the same procedure, without adding the drugs. Finally, unloaded and CUR-MEL-loaded nanoemulsions were filtered using filter paper of 8  $\mu\text{m}$  pore size to remove any drug precipitate and the pH of the resulting colloidal dispersions was adjusted to 5–7. Nanoemulsions were characterized according the droplet size and zeta potential by dynamic light scattering (DLS) and laser-Doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, UK). All formulations were prepared in triplicate.

CUR and MEL content were determined in triplicate after complete dissolution of nanoemulsions in acetonitrile. The total content of drugs was expressed in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Encapsulation efficiency was estimated in triplicate as being the difference between the total content of CUR and MEL found in nanoemulsions and the concentration found in the supernatant obtained from the ultracentrifugation of the sample in Optima MX-XP ultracentrifuge (Beckman Coulter, USA) at speed rate of  $55.000 \times g$  during 30 minutes at 25 °C. The samples were appropriated diluted in acetonitrile, filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  PVDF membrane (Merck Millipore), and injected in the chromatographic system. The encapsulation efficiency (EE%) was expressed as percent of each drug associated to the droplets.

## Results and Discussion

This study aimed the development of a fast and reliable HPLC method to simultaneously determine CUR and MEL in hyaluronic acid coated-nanoemulsions intended to buccal administration. To find the appropriate HPLC conditions for separation, initial runs were performed using acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid solution as the mobile phase in several proportions and at isocratic mode. Regular shaping and no tailing of MEL peak was observed in most cases (Figure 2). On the other hand, commercially available CUR consists of a mixture of three curcuminoids, with CUR as

the main ( $\geq 80\%$ ) constituent and minor amounts of demethoxycurcumin ( $\sim 17\%$ ), and bisdemethoxycurcumin ( $\sim 3\%$ ).<sup>8</sup> Using only acetonitrile and 0.1% formic acid solution, the separation of the peaks corresponding to the three curcuminoids could be not performed and they were co-eluted. To obtain desirable separation of the curcuminoids it was necessary to add methanol in the mobile phase and to determine the most appropriate solvent ratio for separation. The successful separation of CUR, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin peaks was attained using an acetonitrile: methanol: 0.1% (v/v) formic acid (35:15:50, v/v/v) mixture as mobile phase, with a reversed phase column equilibrated at temperature of 40 °C, and a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The curcuminoids peaks could be distinguished from each other based on their retention time, with CUR being the most retained compound.<sup>45</sup> By applying the optimized HPLC method, CUR and MEL exhibited retention times of 7.5 and 2.4 minutes, respectively (Figure 2). MEL (Log *P*  $\sim 1.6$ ) displayed the lower retention time, as it was expected, since it is a more polar drug comparing to CUR (Log *P*  $\sim 3.2$ ).<sup>46,47</sup> The purity of the peaks was confirmed by the comparison of spectra recorded with PDA detector during the registration of chromatographic profile.<sup>48</sup> The  $\lambda_{\text{max}}$  values were determined by scanning with PDA detector from 200 to 500 nm; the maximum light absorption for CUR and MEL occurred at 425 nm and 223 nm, respectively, and these wavelengths were chosen to quantify the drugs in the nanoemulsions.

The system suitability test was used to verify if the chromatographic system is suitable for performing the analyses. Theoretical plate number more than 2000, tailing factor less than 1.5, and RSD less than 2% for repeatability and retention time was set as acceptance criteria.<sup>42</sup> The results obtained in the evaluation of the suitability of the HPLC method are summarized in the Table 1.1. The acceptance criteria were met for all parameters evaluated, testifying the system suitability of the method. The resolution between curcumin and the other curcuminoids was considered satisfactory, since values were equals or exceeds 1.5.

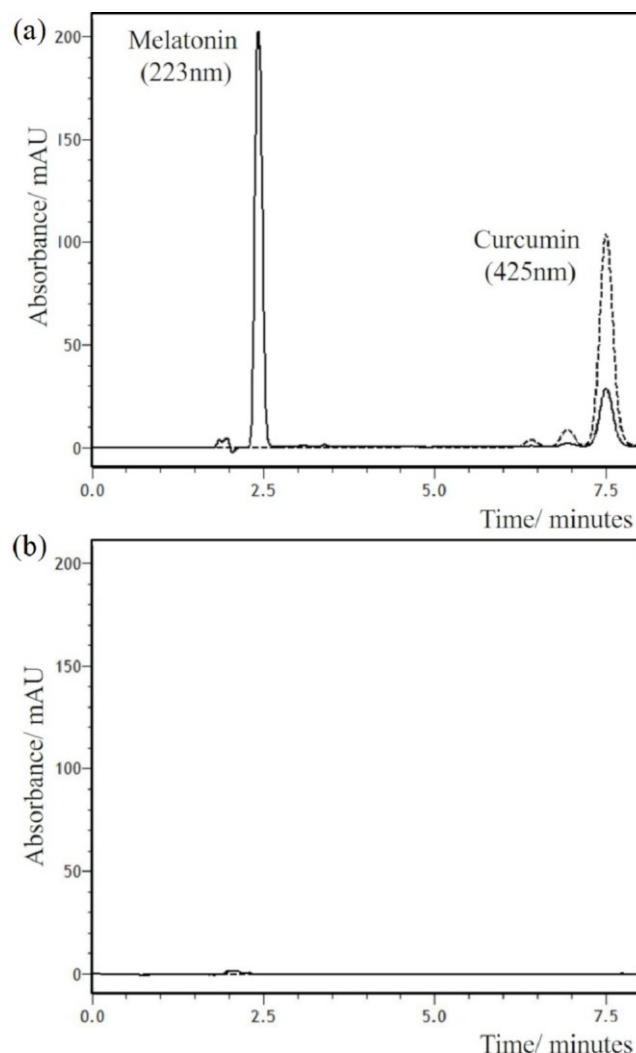
Table 1. 1. Results obtained in the evaluation of the system suitability of the HPLC method (n=6).

Parameters	Curcumin	Melatonin
Retention time <sup>a</sup> / minutes	7.55 ±0.01 (0.14)	2.43 ±0.02 (0.71)
Peak area <sup>a</sup> / mAU	1868417.1 ±13839.5 (0.74)	2317736.1 ±22518.4 (0.97)
Theoretical plate number (N)	8916.5 ±41.9	6005.6 ±85.8
Tailing factor	1.22 ±0.02	1.09 ±0.01

<sup>a</sup> In parenthesis: Percent relative standard deviation.

Specificity was determined by comparing the representative chromatograms obtained after injection of unloaded nanoemulsions (without drugs) and CUR-MEL-loaded nanoemulsions into the chromatographic system. As can be seen in Figure 1.2, the other components of the nanoemulsions did not interfere in the peaks corresponding to the drugs, evidencing the specificity of the method.

Figure 1. 2. Representative chromatographic profiles obtained for (a) CUR-MEL-loaded HA-acid coated nanoemulsions (b) unloaded HA-coated nanoemulsions. Solid and dotted lines correspond to the chromatograms obtained with detection at 223 and 425 nm, respectively.



Linearity was verified by applying the linear regression model to fit the CUR and MEL analytical curves over the concentration range from 0.5 to 20.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and from 1.0 to 40.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Both calibrations curves were demonstrated to be linear over the tested concentration range ( $r > 0.999$ ) (Figure 1.3). Analyses of variance demonstrated there were no significant differences between the values of peak area to drug concentration ratio obtained for each calibration curve ( $F_{\text{calculated}} < F_{\text{critical}}$ , 95% confidence interval) (Table 1.2). The residue analyses are showed in the Figure 3c (CUR) and Figure 3d (MEL). The residue analysis from each calibration curve exhibited random patterns, thus, the homoscedasticity assumption is satisfied indicating a good fit for the

linear model. The LOD and LOQ values for CUR and MEL were 0.09 and 0.23  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 0.30 and 0.85  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, demonstrating that the chromatographic method is suitable enough to detect and quantify these drugs in the HA-coated nanoemulsions.

Figure 1. 3. Representative calibration curve obtained for (a) curcumin and (b) melatonin after injection of working standard solutions at the concentration range from 0.5 to 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (curcumin) and 1.0 to 40.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (melatonin). Residual plots obtained for (c) curcumin and (d) melatonin.

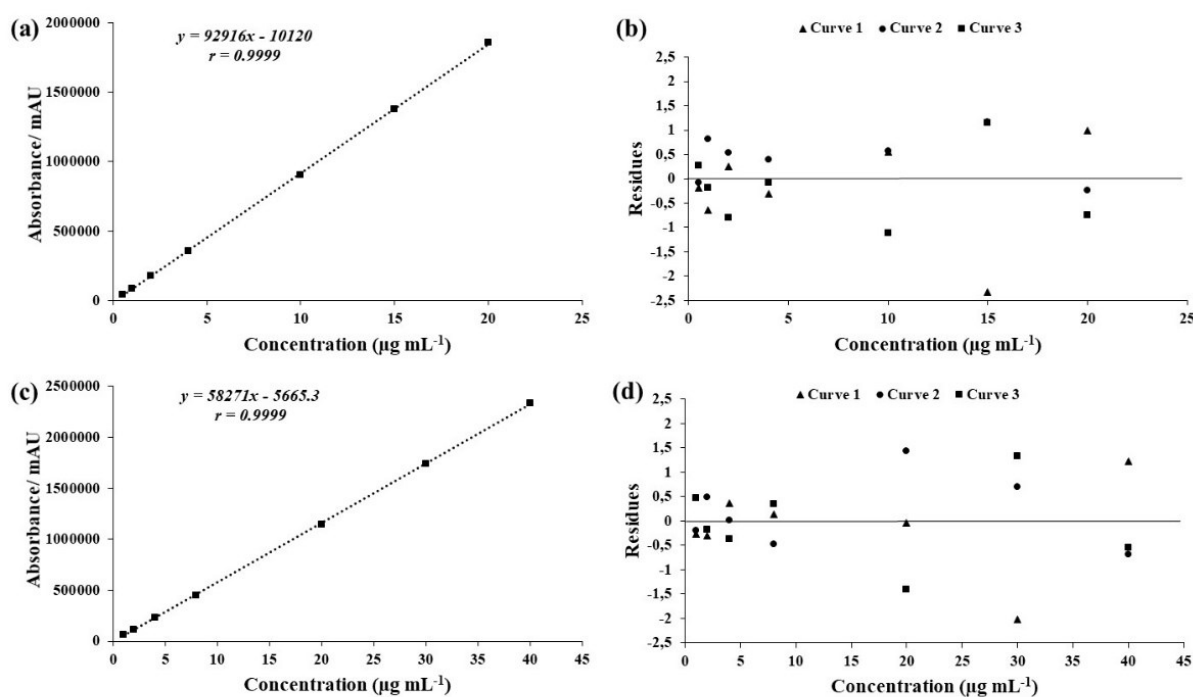


Table 1. 2. Analysis of variance (ANOVA) for the linear regression analysis.

Source of variation	DF <sup>a</sup>	SS <sup>b</sup>	MS <sup>c</sup>	F <sub>calculated</sub>	P-value*	F <sub>critical</sub>
<b>Curcumin</b>						
Between groups	2	17118301.7	8559150.8	0.85	0.44	3.55
Within groups	18	181982006.9	10110111.5			
Total	20	199100308.5				
<b>Melatonin</b>						
Between groups	2	2403530.6	1201765.3	0.43	0.65	3.55
Within groups	18	49438102.5	2746561.2			
Total	20	51841633.1				

<sup>a</sup> Degrees of freedom; <sup>b</sup> Sum of squares; <sup>c</sup> Mean square, \*p > 0,05.

Precision of a method is the closeness of agreement between independent test results obtained under given analytical conditions and includes the measurement of the intra-day (within-day or repeatability) and of the inter-day (between-day) precision. Table 1.3 shows the results obtained in the evaluation of intra-day and inter-day precision for both CUR and MEL. RSD values lower than 5% were obtained for the two drugs, even in the smallest concentration, assuring a satisfactory precision of the HPLC method.

Table 1. 3. Intra-day and inter-day precision for quantification of curcumin (CUR) and melatonin (MEL).

Drug concentration / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Intra-day precision <sup>a</sup>		Inter-day precision <sup>b</sup>	
	Measured concentration / $\mu\text{g mL}^{-1}$	RSD <sup>c</sup> /%	Measured concentration / $\mu\text{g mL}^{-1}$	RSD <sup>c</sup> /%
	CUR			
0.5	0.49 ± 0.02	4.98	0.50 ± 0.01	2.29
4.0	4.06 ± 0.05	1.41	4.08 ± 0.07	1.77
20.0	21.33 ± 0.57	2.70	21.5 ± 0.50	2.32
MEL				
1.0	1.05 ± 0.04	4.15	1.07 ± 0.04	3.75
8.0	8.12 ± 0.16	1.98	8.09 ± 0.11	1.36
40.0	40.56 ± 0.92	2.29	40.73 ± 0.64	1.57

<sup>a</sup> Results expressed as mean ± standard deviation of three drug solutions analyzed in the same day. <sup>b</sup> Results expressed as mean ± standard deviation obtained after analysis of the drug solution in three different days.

<sup>c</sup> Relative standard deviation.

In order to evaluate the accuracy of the chromatographic method, recovery experiments were performed after spiking unloaded HA-coated nanoemulsions with a CUR and MEL standard solution at three different concentration levels (low, medium and high). Drug recovery values varied from 94.78 to 98.33% with RSD values lower than 3% (Table 1.4), thereby indicating a low variability and a close agreement between the experimental and theoretical concentration values.



Table 1. 4. Curcumin (CUR) and melatonin (MEL) recovery values obtained after spiking unloaded nanoemulsions.

Drug Added / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Drug found <sup>a</sup> / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recovery / %	RSD <sup>b</sup> / %
CUR			
0.5	$0.48 \pm 0.01$	$96.22 \pm 2.03$	2.11
4.0	$3.90 \pm 0.10$	$97.50 \pm 2.50$	2.56
20.0	$18.95 \pm 0.26$	$94.78 \pm 1.33$	1.41
MEL			
1.0	$0.98 \pm 0.01$	$98.33 \pm 1.15$	1.17
8.0	$7.78 \pm 0.07$	$97.25 \pm 0.90$	0.92
40.0	$37.96 \pm 1.01$	$94.91 \pm 2.50$	2.63

<sup>a</sup>Results expressed as mean concentration  $\pm$  standard deviation of three determinations; <sup>b</sup>Relative standard deviation.

An HPLC method can be considered robust when it remains unaffected after small changes in the analytical parameters. As can be seen in Table 1.5, small changes in the flow rate, mobile phase composition and pH, column temperature, and wavelength detection did not affect the determination of both CUR and MEL, since the higher RSD value obtained was 4.67%. Then, the developed method proved to be robust for quantification of CUR and MEL in the samples.

Table 1. 5. Effect of changes in the chromatography conditions on the determination of curcumin (CUR) and melatonin (MEL) both at concentration of  $40.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  (n=3).

Parameters		CUR		MEL	
		Recovery / %	RSD <sup>a</sup> / %	Recovery / %	RSD <sup>a</sup> / %
Flow rate / $\text{mL min}^{-1}$	0.9	96.88	2.41	99.6	2.90
	1.1	95.78	3.40	97.5	3.12
Mobile phase composition / (v/v/v)	37:13:50	97.4	3.90	99.6	3.18
	33:17:50	98.0	2.45	100.3	3.41
Mobile phase pH	3.2	95.9	4.67	98.6	2.11
	3.8	96.1	4.44	99.5	1.79
Temperature / $^{\circ}\text{C}$	37	97.40	3.14	97.4	3.60
	43	96.79	1.45	101.4	2.76
Wavelength / nm	422/220	98.78	2.34	98.78	1.43
	428/226	96.10	3.56	99.98	4.13

## Method applicability

Uncoated and hyaluronic acid-coated nanoemulsions were successfully obtained by the spontaneous emulsification method. Both colloidal dispersions displayed size in nanometric range (~200 nm) and monodispersed droplet size distribution (PDI ~ 0.2). Uncoated nanoemulsions exhibited a positively charged surface as expected, due the presence of the cationic surfactant CTAB at the oil-water interface of droplets. The addition of HA in the nanoemulsion caused not only an increase of the droplet size, but also the reduction of the zeta potential value. HA is negatively charged glycosaminoglycan<sup>49</sup> and therefore, it may be deposited onto droplet surface provoking a partial neutralization of the charges by the electrostatic interaction of its carboxylated groups with the positively charged quaternary ammonium group of CTAB (Table 1.6).<sup>50,51</sup>

Table 1. 6. Physicochemical properties and curcumin (CUR) and melatonin (MEL) loading of uncoated (NE<sub>CUR/MEL</sub>) and hyaluronic acid-coated nanoemulsions (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>) (n=3).

Formulation	Size <sup>a</sup> / nm	Zeta / mV	Drug content / $\mu\text{g mL}^{-1}$		EE <sup>b</sup> / %	
			CUR	MEL	CUR	MEL
NE <sub>CUR/MEL</sub>	179.7 $\pm$ 9.8 (0.116)	41.6 $\pm$ 1.0	85.2 $\pm$ 1.7	501.4 $\pm$ 5.5	83.7 $\pm$ 2.1	20.9 $\pm$ 3.5
HA-NE <sub>CUR/MEL</sub>	234.8 $\pm$ 10.0 (0.220)	17.8 $\pm$ 2.2	63.5 $\pm$ 2.9	271.9 $\pm$ 10.0	95.9 $\pm$ 1.2	19.9 $\pm$ 2.4

<sup>a</sup> In parenthesis: polydispersion index. <sup>b</sup> Encapsulation efficiency

The chromatographic method once validated was applied to simultaneously estimate CUR and MEL in uncoated and HA-coated nanoemulsions (Table 6). When uncoated nanoemulsion were analyzed, CUR and MEL content were found to be 85.2  $\pm$  1.7 and 501.4  $\pm$  5.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, while EE% were found to be 83.7  $\pm$  2.1% and 20.9  $\pm$  3.5% for the respective drug. The differences in the drug solubility expressed by their log *P* can again explain the different EE% values; CUR is a more lipophilic drug and, therefore, it is found preferentially associated to the nanoemulsion droplets, while MEL, presenting higher water solubility, is preferentially partitioned towards the aqueous phase. The addition of HA to nanoemulsion formulations caused a reduction in both CUR and MEL content to 63.5  $\pm$  2.9% and 271.9  $\pm$  10.0%, respectively. In fact, we have

hypothesized that HA coating changes the oil-water interface properties, reducing the ability of these drugs to adsorb onto droplet surface. However, further studies should be carried out to confirm this hypothesis. Even though, the HPLC-PDA method developed and validated in this study was successfully applied to simultaneously determine CUR and MEL in nanoemulsions, which are promising formulations with antitumor properties.

## **Conclusions**

In this study, an HPLC-PDA method was developed and validated for simultaneous determination of CUR and MEL in nanoemulsions intended to the treatment of cancers of the oral cavity. Peaks corresponding to MEL and CUR could be well separated using an analytical procedure with a chromatographic run time of only 8 minutes, allowing the analyses of a large number of samples in a short period. This method also proved to be reliable, fast and simple, complying with the requirements of linearity, specificity, precision, accuracy, and robustness. Thus, this method was found to be suitable for determining CUR and MEL loaded into hyaluronic acid-coated nanoemulsions.

## **Conflicts of interest**

The authors state no conflicts of interest.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support.

## References

1. Bishayee, A.; *Proceedings*. **2017**, *1*, 982.
2. Khazir, J.; Riley, D.; Pilcher, L.; De Maayer, P.; Mir, B.; *Nat. Prod. Comun.* **2014**, *9*, 1655.
3. Cragg, G. M.; Pezzuto, J. M.; *Med. Princ. Pract.* **2016**, *25*, 41.
4. Gerenu, G.; Liu, K.; Chojnacki, J. E.; Saathoff, J. M.; Martinez-Martin, P.; Perry, G.; Zhu, X.; Lee, H.; Zhang, S.; *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6*, 1393.
5. Hu, A.; Huang, J.; Li, R.; Lu, Z.; Duan, J.; Xu, W.; Chen, X.; Fan, J.; *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1.
6. Prasad, S.; Tyagi, A. K.; Aggarwal, B. B.; *Cancer Res. Treat.* **2014**, *46*, 2.
7. Wilken, R.; Veena, M. S.; Wang, M. B.; Srivatsan, E. S.; *Mol. Cancer.* **2011**, *10*, 12.
8. Jangle, R. D.; Thorat, B. N.; *Indian J. Pharm. Sci.* **2013**, *75*, 60.
9. Yeh, C. M.; Su, S. C.; Lin, C. W.; Yang, W. E.; Chien, M. H.; Reiter, R. J.; Yang, S. F.; *Oncotarget.* **2017**, *8*, 90545.
10. Agathokleous, E.; Kitao, M.; Calabrese, E. J.; *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *299*, 163.
11. Shen, Y. Q.; Guerra-Libero, A.; Fernandez-Gil, B. I.; Florido, J.; Garcia-Lopez, S.; Martinez-Ruiz, L.; Mendivil-Perez, M.; Soto-Mercado, V.; Acuna-Castroviejo, D.; Ortega-Arellano, H.; Carriel, V.; Diaz-Casado, M. E.; Reiter, R. J.; Rusanova, I.; Nieto, A.; Lopez, L. C.; Escames, G.; *J. Pineal Res.* **2018**, *64*, 1.
12. Fernandez-gil, B. I.; Guerra-Libero, A.; Shen, Y.; Florido, J.; Martinez-Ruiz, L.; Garcia-Lopez, S.; Adan, C.; Rodriguez-Santana, C.; Acuna-Castroviejo, D.; Quinones-Hinojosa, A.; Fernandez-Martinez, J.; Moneim, A. E. A.; Lopez, L. C.; Ferrer, R.; Escames, G.; *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1.
13. Harpsoe, N. G.; Andersen, L. P. H.; Gögenur, I.; Rosenberg, J.; *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *71*, 901.
14. Najafi, M.; Salehi, E.; Farhood, B.; Nashtaei, M. S.; Hashemi, G. N.; Khanlarkhani, N.; Namjoo, Z.; Mortezaee, K.; *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 2356.
15. Favero, G.; Rodella, L. F.; Reiter, R. J.; Rezzani, R.; *Mol. Cell. Endocrinol.* **2014**, *382*, 926.
16. Yang, C. Y.; Lin, C. K.; Tsao, C. H.; Hsieh, C. C.; Lin, G. J.; Ma, K. H.; Shieh, Y. S.; Sytwu, H. K.; Chen, Y. W.; *Oncotarget.* **2017**, *8*, 33756.
17. Cutando, A.; Lopez-Valverde, A.; Diego, R. G.; Vicente, J.; Reiter, R.; Fernandez, R. H.; Ferrera, M. J.; *Odontology.* **2014**, *102*, 290.
18. Tordjman, S.; Chokron, S.; Delorme, R.; Charrier, A.; Bellissant, Eric.; Jaafari, N.;

- Fougerou, C.; *Curr. Neuropharmacol.* **2017**, *15*, 434.
19. Lu, H.; Baolei, W.; Ma, G.; Zheng, D.; Song, R.; Huang, E.; Mao, M., Lu, B.; *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 5361.
20. Mehta, A.; Kaur, G.; *Indian J. Dent.* **2014**, *5*, 56.
21. Ardito, F.; Perrone, D.; Giuliani, M.; Testa, N. F.; Muzio, L.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 233.
22. Morales, J. O.; Brayden, D. J.; *Curr. Opin. Pharmacol.* **2017**, *36*, 22.
23. Marcazzan, S.; Varoni, E. M.; Blanco, E.; Lodi, G.; Ferrari, M.; *Oral Oncol.* **2018**, *76*, 1.
24. Helgeson, M. E.; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2016**, *25*, 39.
25. Sasikumar, A.; Kamalasanan, K.; *J. Control. Release.* **2017**, *260*, 111.
26. Tiwari, S.; Bahadur, P.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 556.
27. Cai, J.; Fu, J.; Li, R.; Zhang, F.; Ling, G.; Zhang, P.; *Carbohydr. Polym.* **2019**, *208*, 356.
28. Zhong, L. Yanying, L.; Lu, X.; Qingsong, L.; Dongyang, Z.; Zhenbao, L.; Huicong, Z.; Haotian, Z.; Qiming, K.; Jin, S.; Zhonggui, H.; *Asian J. Pharm. Sci.* **2018**, *27*, 10.
29. Gotov, O.; Battogtokh, G.; Shin, D.; Ko, Y. T.; *J. Ind. Eng. Chem.* **2018**, *65*, 236.
30. Lindner, G.; Khalil, N. M.; Mainardes, R. M.; *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 1.
31. Martins, L. G.; Khalil, N. M.; Mainardes, R. M.; *J. Pharm. Anal.* **2017**, *7*, 388.
32. Schiborr, C.; Eckert, G. P.; Rimbach, G.; Frank, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1917.
33. Yang, X.; Ma, J.; Ye, Y.; Zhang, Y.; Lin, G.; Zheng, Y.; Li, X., Wang, X.; *Chromatographia.* **2011**, *73*, 605.
34. Inoue, K.; Hamasaki, s.;Yoshimura, Y.; Yamada, M.; Nakamura, M.; Ito, Y.; Nakazawa, H.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 53.
35. Han, Y. R.; Zhu, J. J.; Wang, Y. R.; Wang, X. S.; Liao, Y. H.; *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25*, 1144.
36. Fonseca-Santos, B.; Gremião, M. P. D.; Chorilli, M.; *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, 1029.
37. Korany, M. A.; Haggag, R. S.; Ragab, M. A. A.; Elmallah, O. A.; *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, 1711.
38. Rizzo, V.; Porta, C.; Moroni, M.; Scoglio, E.; Moratti, R.; *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *774*, 17.

39. Talebianpoor, M. S.; Khodadost, S.; Rozbehi, A.; Toori, A.; Zoladl, M.; Ghaedi, M.; Mohammadi, R.; Hosseinzadeh, A. S.; *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, *960*, 1.
40. Azizoğlu, G.; Azizoğlu, E.; Tuncay Tanriverdi, S.; Özer, Ö.; *Marmara Pharm. J.* **2017**, *21*, 921.
41. Swartz, M.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2010**, *33*, 1130.
42. International Conference on Harmonization Tripartite Guideline. *Validation of Analytical Procedures: text and methodology*, Q2 (R1); ICH: Geneva, CH, 2005.
43. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 166. *Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos.*; ANVISA: Brasília, BRA, 2017.
44. Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H.; *Int. J. Pharm.* **2004**, *280*, 241.
45. Shervington, L. A.; Shervington, A.; Ingham, O.; *Nat. Prod. Chem. Res.* **2016**, *4*, 1.
46. Filali, S.; Bergamelli, C.; Lamine, T. M.; Salmon, D.; Laleye, D.; Dhelens, C.; Diouf, E.; Pivot, C.; Pirot, F.; *J. Pharm. Anal.* **2017**, *7*, 237.
47. Yang, R.; Zhang, S.; Kong, D.; Gao, X.; Zhao, Y.; Wang, Z.; *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 3512.
48. Papadoyannis, I. N.; Gika, H. G.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2010**, *6076*, 1198.
49. Li, D.; Qin, J.; Lv, J.; Yang, J.; Yan, G.; *RSC Adv.* **2018**, *8*, 2873.
50. Oyarzun-ampuero, F. A.; Rivera-rodríguez, G. R.; Alonso, M. J.; Torres, D.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 483.
51. Pradhan, R.; Ramasamy, T.; Choi, J. Y.; Kim, J. H.; Poudel, B. K.; Tak, J. W.; Nukolova, N.; Choi, H. G.; Yong, C. S.; Kim, J. O.; *Carbohydr. Polym.* **2015**, *123*, 313.

**CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS  
NANOEMULSÕES REVESTIDAS COM ÁCIDO HIALURÔNICO CONTENDO  
CURCUMINA E MELATONINA**

---





A base do tratamento de muitos tipos de câncer se fundamenta na modalidade terapêutica que combine dois ou mais fármacos, essa prática ganhou espaço ao longo do tempo devido a heterogeneidade genética e fenotípica apresentada pelas células tumorais, o que resulta em respostas distintas entre os pacientes e dentro de um mesmo tumor, tornando difícil a previsão de sucesso na eficácia da terapia (PALMER; SORGER, 2017). Considerando a baixa eficácia e alta toxicidade que alguns fármacos anticâncer existentes na atualidade podem ter, a pesquisa de novos candidatos terapêuticos nessa área é extensa. Entretanto, o processo de desenvolvimento de novos fármacos envolve anos de pesquisa sendo extremamente caro e demorado. Dessa forma, uma estratégia seria a utilização de agentes terapêuticos já utilizados no tratamento de outras patologias, cuja as vias de alvo de ação sejam semelhantes ao câncer (MOKHTARI *et al.*, 2017).

A MEL e CUR são produtos naturais extensivamente estudados ao longo dos anos, entre as diversas aplicações investigadas para essas moléculas suas propriedades antitumorais merecem destaque. Já é conhecida sua atividade frente a vários tipos de câncer, entre eles, o câncer de boca. Contudo, a CUR e MEL são moléculas que apresentam limitações quanto a biodisponibilidade em virtude da baixa solubilidade, extenso metabolismo de primeira passagem e rápida excreção, sendo necessário a investigação de sistemas de liberação de fármacos capazes de superar essas barreiras (ARDITO *et al.*, 2018; CUTANDO *et al.*, 2014; D'SOUZA; ADDEPALLI, 2018; LIU; MADU; LU, 2018; MEHTA; KAUR, 2014; YANG *et al.*, 2017).

A inclusão desses fármacos em NE pode ser uma solução eficiente, capaz não só melhorar as propriedades físico-químicas, mas também oferecer direcionamento específico às células tumorais por meio da adição de diferentes constituintes à superfície de sua estrutura (SÁNCHEZ-LÓPEZ *et al.*, 2019). Considerando os receptores superexpressos nas células tumorais, o CD44 se destaca como alvo de novas terapias de câncer, incluindo pesquisas relacionadas ao CCP (MATTHEOLABAKIS *et al.*, 2015). O HA pode ser adicionado à superfície das NE visando o direcionamento às células CD44+, esse componente além de afinidade por esses receptores, se trata de um glicosaminoglicano natural, biocompatível, não imunogênico e com reconhecidas propriedades mucoadesivas (SANDRI *et al.*, 2004; WICKENS *et al.*, 2017). O que permite o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados com capacidade de direcionamento às células CD44+, tais como aquelas presentes no câncer de boca. E

ainda, sua aplicação local diretamente na mucosa bucal, podendo ser uma estratégia terapêutica complementar ao tratamento convencional.

Considerando o que foi mencionado até aqui, o Capítulo II contempla o desenvolvimento e caracterização de NE revestidas com HA associando CUR e MEL e sua atividade citotóxica em uma linhagem saudável (HACAT) e tumoral (CAL27). Inicialmente foi realizada a otimização das características de tamanho, potencial zeta e distribuição granulométrica das formulações quanto ao tipo e concentração de lipídio catiônico empregado. Em seguida, o tipo de óleo vegetal também foi estudado, afim de aumentar a associação dos fármacos. Os dados referentes recuperação e eficiência de associação de CUR e MEL com os diferentes óleos encontra-se no Apêndice A. Com a definição da composição da NE inicial de característica catiônica, foram avaliadas diferentes concentrações e pesos moleculares de HA para proceder o revestimento através de interação eletrostática. Para analisar o feito do revestimento e da associação dos fármacos, NE não revestidas e contendo somente CUR também foram incluídas nesse estudo. A caracterização das formulações desenvolvidas, assim como sua atividade citotóxica estão descritas na forma de manuscrito, o qual foi submetido para publicação no periódico *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.

*Manuscrito 2: Hyaluronic acid-coated nanoemulsions co-delivering curcumin and melatonin to treat the oral cancer: preparation, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation*

---



**Hyaluronic acid-coated nanoemulsions co-delivering curcumin and melatonin to treat the oral cancer: preparation, characterization and *in vitro* cytotoxicity evaluation**

Edna da Silva Vieira<sup>a</sup>, Eduarda Talita Bramorski Mohr<sup>b</sup>, Eduardo Monguilhott Dalmarco<sup>b</sup>, Elenara Lemos-Senna<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Research in Immunopharmacology, Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

\* Corresponding author: [lemos.senna@ufsc.br](mailto:lemos.senna@ufsc.br)

## Abstract

Curcumin (CUR) and melatonin (MEL) are natural compounds that have exhibited anticancer effects against oral squamous cell carcinoma (OSCC). However, despite the advantages of the local treatment of oral cancer, the delivery of drugs in the oral cavity may be challenging since drugs need to overcome the mechanical effects of the salivary washout that can quickly remove the dosage form from oral mucosa. Nanoemulsions have emerged as potential carriers for drug release in the oral cavity, allowing the delivery of both hydrophilic and hydrophobic drugs in the same formulation. Besides, nanoemulsions may have their surface modified by introducing different types of ligands to target receptors expressed on the surface of the cells. Considering that, in this study, we describe the development of cationic nanoemulsions co-delivering CUR and MEL (NE<sub>CUR/MEL</sub>) as a new approach for adjuvant treatment of OSCC. Aiming to target the cluster-determinant 44 (CD44) receptor, which is overexpressed in the OSCC, the nanoemulsions were coated with hyaluronic acid (HA) to generate CUR/MEL-loaded HA-coated nanoemulsions (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>). The nanoemulsions were prepared and characterized according to size, zeta potential, drug loading, accelerated stability, and release profiles. The mucoadhesive properties of both NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> were demonstrated by their strong ability to interact with the mucin. *In vitro* cytotoxicity studies were carried out on the HACAT and CAL27 cell lines by using the MTT method. These studies demonstrated that the CUR and MEL combination in HA-NE significantly decreased the viability of CAL27 cell line by inducing apoptosis, but showed a protective effect on the HACAT cell line. These findings suggest that HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> may be considered a promising approach for the coadjuvant treatment of oral cancer.

**Keywords:** Curcumin, melatonin, oral cancer, mucoadhesion, nanoemulsions, hyaluronic acid.

## Introduction

Head and neck cancer (HNC) was the seventh most common cancer worldwide in 2018, representing 3% of all cancers [1]. HNC encompasses epithelial malignancies arising from the paranasal sinuses, nasal cavity, oral cavity, pharynx, larynx, and salivary glands. The vast majority (more than 90%) of these epithelial malignancies are squamous cell carcinomas, for which tobacco and alcohol are the most important factors of risk [2,3]. In particular, oral cancer is a type of head and neck cancer that arises on the lip or oral cavity, with different levels of differentiation and a propensity for lymph node metastasis. Approaches to the treatment of oral cancer depend on the stage of the disease and may include surgery, radiation therapy, and chemotherapy [4].

Effective cancer chemotherapy requires the reach of therapeutic concentrations of the drugs in the tumor site. In oral cancer, the easy access to the oral cavity allows the local delivery of chemotherapy drugs to directly treat the lesions, avoiding undesirable side effects, and improving the quality of life of patients [5–7]. However, the limited absorption area, the barrier properties of the oral mucosa, the washing effect of saliva, and mechanical stress that results in a short retention time of the conventional dosage forms to the oral mucosa are obstacles that drugs meet when administered by the buccal route [8,9]. With this regard, the use of nanoscale-based formulations may overcome some of the drawbacks of the buccal administration. Nanocarriers may increase the diffusion rate of the drugs across the mucus layer and protect the drug from degradation and saliva dilution. In addition, nanocarriers presenting mucoadhesive properties by using hydrophilic polymers are able to interact with the mucus layer, increasing the residence time of the formulation on the mucosa surface and successfully delivering the drug [10,11].

Nanoemulsions have emerged as potential carriers to deliver drugs to the oral cavity. These colloidal systems are kinetically stable emulsions, generally oil-in-water, with droplet size in the nanometer range, which are able to deliver both hydrophilic and hydrophobic drugs. Their advantages over other nanocarriers include the remarkable capacity of hydrophobic drug solubilization, ease of preparation, and ability to improve the bioavailability of drugs, besides to be formulated using generally regarded as safe (GRAS) excipients [12–14]. In addition, nanoemulsions may have their surface modified

by introducing different types of ligands to target receptors expressed on the surface of the cells [15].

Hyaluronic acid (HA) is a linear anionic polysaccharide present in vertebrates' extracellular matrix of connective tissues. It is composed of repeating units of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine linked together through alternating  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds [16–18]. HA is a typical hydrophilic macromolecule displaying mucoadhesive properties since it can bind the mucin proteins by hydrogen bonds through the hydroxyl group [10,11]. Also, HA binds specifically to the cluster-determinant 44 (CD44) receptor, an extracellular protein on cell membranes, and regulates diverse cellular responses. CD44 is a cell surface marker that is overexpressed in tumors, such as oral squamous cell carcinoma (OSCC), and has low expression in normal tissues [19,20]. Indeed, apart from mucoadhesive character, HA offers the possibility of targeting and promotes the intracellular access by endocytosis of the drug-loaded nanocarrier to the cancer cells that overexpress CD44. Therefore, HA has attracted much attention for drug delivery purposes [21–23]. Nanocarriers coated with HA can be prepared through electrostatic attraction by ionic interaction between HA and conveniently stabilized cationic nanoemulsions. The process is simple and controllable without introducing chemical reagents [19,23,24].

Bioactive molecules extracted from diverse natural sources have been considered potential drug candidates for anticancer therapy [25–27]. Curcumin or diferuloylmethane is a polyphenol obtained by extraction and purification of rhizomes of spice turmeric (*Curcuma longa* L.) [25,28,29]. CUR has gained widespread recognition due to its remarkable anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer effects [5,7]. The anticancer activities of CUR are attributable to its antiproliferative, antiangiogenic, antimetastatic, and pro-apoptotic properties. In vitro and in vivo studies reported that CUR inhibited cell proliferation in various oral cancer cell lines and human cancer xenografts in nude mice [30–35]. Another natural-derived substance with anticancer activity is MEL, also known as N-acetyl-5-methoxy-tryptamine. MEL is a hormone produced in animals by the pineal gland and plants under stress [36–38]. MEL has a variety of biological properties, including anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory activities. This hormone has oncostatic activity through various mechanisms, including antiproliferative, anticancer immunity stimulation, modulation of expression of oncogenes, anti-inflammatory, antioxidant, antiangiogenic, and



antimetastatic effects [39]. Several studies have indicated that MEL reduces the expression of metalloproteinases and inhibits the invasion and metastasis of oral cancer cell lines, besides inhibiting cell viability and angiogenesis [36,39–41].

Considering the above mentioned, in this study, we describe the development of HA-coated nanoemulsions (HA-NE) co-delivering CUR and MEL as a new approach for adjuvant treatment of OSCC. Previous research has shown that MEL synergized the inhibitory effect of CUR against the growth of bladder cancer by enhancing the antiproliferation, antimigration, and pro-apoptotic activities [42]. Herein, we hypothesize that CUR and MEL co-administered as mucoadhesive and targetable nanoemulsions could also improve the antitumor effect against OSCC. HA-NEs co-encapsulating CUR and MEL were prepared and characterized, and the *in vitro* cytotoxicity of this new formulation was investigated on a CD44 overexpressing cell line of human oral cancer (CAL27) and a human non-tumorigenic keratinocyte cell line (HACAT).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Castor oil, hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), Oleylamine (OE), hyaluronic acid (HA, molecular weight 15–30 kDa and 70–90 kDa), curcumin (CUR,  $\geq$  94% curcumin content), melatonin MEL, ( $\geq$  98% melatonin), sodium dodecyl sulfate and mucin from the porcine stomach (type III) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Hydrogenated soybean lecithin (Lipoid S100, 97.5% phosphatidylcholine) was purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Periodic acid, Schiff reagent, ethanol and acetone were purchased from Dinâmica (São Paulo, SP, Brazil). All other solvents and reagents were of analytical grade and used without further purification. The human tongue squamous cell carcinoma cell line (CAL27) and spontaneously immortalized human keratinocyte cell line (HACAT) were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), hams F12 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, versene®, tripan blue dye and trypsin were purchased from Gibco (Grand Island, New York, USA). The annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) and 7-AminoactinomycinD (7AAD) Kit was obtained from BD

Bioscience (San Diego, California, USA). The others reagents used and non-listed were obtained from alternatives commercial sources.

## *2.2. Preparation of the nanoemulsions*

Unloaded nanoemulsions (unloaded-NE) and CUR/MEL-loaded NE ( $NE_{CUR/MEL}$ ) were prepared by the spontaneous emulsification method [43]. Briefly, 400 mg of castor oil, 60 mg of lecithin, and CTAB (0.012 to 0.5 mM) were dissolved in 20 mL of an ethanol and acetone mixture (1:3, v/v) to obtain the organic phase of the formulations. When present, CUR and MEL are added to the organic phase. Next, the resulting solution was added dropwise to the 40 mL of aqueous phase under vigorously magnetic stirring for 10 min. The obtained colloidal dispersions were then submitted to evaporation under reduced pressure to remove the organic solvent and concentrated to reach a volume of 20 mL. The pH of the formulations was adjusted to 6.5 with a 0.1 M NaOH solution. All formulations were prepared in triplicate.

## *2.3 Preparation of hyaluronic-coated nanoemulsions (HA-NE)*

HA-NEs were prepared based on electrostatic interactions [19,24]. Briefly, 15–30 kDa or 70–90 kDa HA aqueous solutions were prepared at concentrations of 0.2, 0.3, 0.4 or 0.5 mg/mL. Then, 1 mL of unloaded-NE was slowly added under vigorous magnetic stirring to 1 mL of each HA solution. The HA-NEs were characterized according to size and zeta potential, and the optimal HA concentration was selected to prepare CUR and MEL-loaded HA-coated nanoemulsions ( $HA-NE_{CUR/MEL}$ ). All formulations were prepared in triplicate.

## *2.4. Characterization of the nanoemulsions*

### *2.4.1. Droplet size and zeta potential*

The droplet size and zeta potential of the nanoemulsions were determined using a Zetasizer Nano ZS<sup>®</sup> (Malvern Instruments, UK) after appropriated dilution of the samples with ultrapure water. The mean droplet size and polydispersity index (PDI) were

determined by dynamic light scattering at 25 °C and a detection angle of 173°. Zeta potential measurements were carried out by laser doppler anemometry. For the analyses, the samples were placed in electrophoretic cells where a potential of  $\pm 150$  mV was applied. The zeta potential values were calculated as mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation [44]. All samples were analyzed in triplicate and the data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

#### 2.4.2 Morphology

The morphological examination of NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> was carried out using a JEM-1011 transmission electron microscope (Jeol, Japan), operating a 100 kV. One drop of each nanoemulsion was deposited on a copper grid with ultrathin carbon film supported by a lacey carbon film and left to dry for 1 min. The samples were then negatively stained with 2% *phosphotungstic acid* and left to dry under vacuum at room temperature before observations.

#### 2.4.3. Entrapment efficiency (EE) and drug content

CUR and MEL content were simultaneously determined using a validated high-performance liquid chromatography (HPLC) method, *as reported in our previous study [45]*. The analysis was performed in a Shimadzu HPLC system (Japan) equipped with an LC-20AD binary pump, an SIL-20AC HT auto-sampler, a CTO-20A forced air-circulation-type column oven, an SPD-M20 photo diode array UV-Vis detector, and a software LC Solution. The analyses were carried out in reversed phase mode using a Phenomenex® Luna C18 column (150  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu$ m; USA), conditioned at 40 °C. The samples were eluate in isocratic mode using a mobile phase consisting of acetonitrile, methanol and 0.1% (v/v) formic acid aqueous solution (35:15:50; v/v/v). The sample injection volume was 10  $\mu$ L, and CUR and MEL were detected at wavelengths of 223 and 425, respectively. The run time was 8 min. For HPLC analysis, an aliquot of the NE<sub>CUR/MEL</sub> or HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> was completely dissolved in acetonitrile (total concentration). The entrapment efficiency (EE%) was estimated as being the difference between the total concentration of CUR and MEL found in nanoemulsions and the concentrations found in the supernatant obtained after ultracentrifugation of the samples

(Optima MX-XP, Beckman Coulter, USA) at 55,000 g during 30 min at 25 °C. All samples were *filtered* through 0.22 µm before injection in the HPLC system. The EE was expressed as percentage of each drug associated to the droplets. The results are expressed as mean ± SD of three different formulations.

### 2.5 Nanoemulsion stability

The accelerated stability of NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> was evaluated using an analytical centrifuge (LUMi-Sizer<sup>®</sup>, L.U.M. GmbH, Germany) which consists of a centrifugal rotor with 12 optical cells and a light source (pulsed near-infrared light-emitting 880 nm diode and a light sensor). By this technique, the intensity of the transmitted near-infrared light is measured as a function of time and position over the entire sample length, while the samples are simultaneously subjected to centrifugal force. For the analysis, 400 µL of each sample was placed into polycarbonate optical cells and subjected to rotation at 4.000 rpm for 7.200 s, at a temperature of 4 °C and 25 °C. During the centrifugation transmission profiles were recorded at 865 nm and at time interval of 10 s. The samples were analyzed in triplicate without prior dilution. The results were displayed as space- and time-related transmission profiles over the sample, and instability index were calculated [46].

### 2.6. *In vitro* release studies

The *in vitro* release of CUR and MEL from nanoemulsions was evaluated by the dialysis bag method. Briefly, 1 mL of NE<sub>CUR/MEL</sub>, HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>, or a free drugs solution was added to the dialysis bags. The dialysis bags were placed in amber flasks containing 100 mL of phosphate buffer saline (PBS) 0.01 M pH 6.5 added of 0.25 % (w/v) of sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sink condition). The samples were maintained at 37 ±1 °C under magnetic stirring and protected from light to avoid degradation. At predetermined time intervals, 1 mL of the release medium was withdrawn, and withdrawn volume was replaced with the fresh medium to maintain sink condition. The samples were analyzed for CUR and MEL content by the HPLC method as previously described, and cumulative CUR and MEL release profiles were constructed.

## 2.7. Evaluation of the mucoadhesive and mucopenetration properties

### 2.7.1 Evaluation of interactions with mucin

The mucoadhesive properties of NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> were evaluated using mucin from the porcine stomach (type III). The mucin's soluble fraction was isolated to remove aggregates that could influence the analysis [47]. In order to evaluate the interactions between mucin and nanoemulsions, mucin dispersions were prepared in phosphate buffer 0.01 M pH 6.5 at concentrations of 100, 250, and 500 µg/mL. Next, 100 µL of NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> were added to 5 mL of the mucin dispersion and the mixture was maintained at  $37 \pm 1$  °C under magnetic *stirring* for 30 min. Then, the mean droplet size and zeta potential of the dispersions were measured as described in 2.4.1. The amount of mucin adsorbed on nanoemulsions was determined by a colorimetric method using periodic acid/Schiff (PAS) staining [48]. The nanoemulsion/mucin mixtures were centrifuged at 200,000 g for 20 min at 20 °C. For the analyzes, 0.1 mL of periodic acid reagent was added to 1 mL of the supernatants and incubated at  $37 \pm 1$  °C for 2 h. Next, 0.1 mL of the Schiff reagent was added and the resulting solutions kept at room temperature (30 min). The absorbance of the samples was then determined in a SpectraMax<sup>®</sup> multi-mode microplate reader (Molecular Devices, USA) at 555 nm. The amount of adsorbed mucin was calculated as being the difference between total mucin in the dispersion and free mucin obtained after contact with nanoemulsions [49]. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of six different formulations measurements.

### 2.7.2. Evaluation of mucoadhesive strength

The mucoadhesive strength of NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> was evaluated by measuring the force required to detach the formulation from a mucin disc using a texture analyzer (TA-XTplus, Stable Micro Systems, UK) in tension mode, as previously described [50,51]. Before mucoadhesion testing, the mucin disc was hydrated by submersion in PBS for 5 s. The excess surface liquid was removed by gentle blotting. Samples were placed at the lower platform, while mucin discs were attached to the upper probe of the device. The upper probe was lowered at a speed of 1 mm/s to touch the surface of nanoemulsion, with an applied force of 0.1 N for 60 s to ensure intimate contact

between the mucin disc and the sample. The probe was then moved upwards at a constant speed of 1 mm/s, and the force required to detach the mucin disc from the surface of each formulation was determined from the resulting force- plot [52]. The maximum adhesion force ( $F_{\max}$ ) was defined as the maximum force to separate the formulation from a mucin substrate, and the work of adhesion ( $W_{\text{adh}}$ ) was based on the area under a force-distance curve obtained during the detachment process [51,53]. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three different measurements of each nanoemulsion.

### 2.8. Cell culture and *in vitro* cytotoxicity

The cells were cultured on DMEM (CAL27) or DMEM/F12 (HACAT) supplemented with 10% FBS and 1% Antibiotics (100 U/mL penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin). The formulations cytotoxicity effect was evaluated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, already described [54]. HACAT and CAL27 cells were seeded in 96-well plates ( $2.5 \times 10^4$  cells/well) and incubated at 37°C for 24h until accomplish complete adherence and confluence (in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere). Free drugs, drugs loaded nanoemulsions or unloaded nanoemulsions were added to wells at concentrations ranging from 2.1  $\mu\text{M}$  to 35  $\mu\text{M}$  and from 21.4  $\mu\text{M}$  to 345  $\mu\text{M}$  of CUR and MEL, respectively. The cells were incubated at 37 °C for 24 h. Then, the culture medium was replaced by MTT solution (5mg/mL), followed by an incubation time of 2h. Control group was performed in these identical conditions using the same amount of DMSO and cell viability was considered 100%. The MTT solution was removed and the crystals were resuspended in DMSO. The results were evaluated by an ELISA reader, using a 450 nm wavelength. The *in vitro* assays were performed in triplicate and were repeated on different days.

### 2.9. Cell apoptosis assay

HACAT and CAL27 were seeded ( $5 \times 10^4$  cell/well) individually in 24-well plates for 48h prior the assay. The cells were treated with unloaded nanoemulsions, free drugs and drugs loaded nanoemulsions at concentration of 30  $\mu\text{M}$  (CUR) and 295  $\mu\text{M}$  (MEL) for 24 h (n=3/group). Then, the cells were scraped with trypsin and centrifuged with DMEM (900 x g, 5 min, at 4°C). In the next step, cells were washed with cold

phosphate buffered saline (PBS - pH 7.6) and centrifuged twice (900 x g, 5 min, at 4°C). The supernatant was discarded and the pellets were suspending in binding buffer (0.1M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>). For the analysis of apoptosis, the cells were double-stained with Annexin V and 7-AAD using the Annexin V PE Apoptosis Detection kit according to the manufacturer's instructions and analyzed by FACVerse® flow cytometer (BD Biosciences, San Jose - CA, USA), using the FACSuite® software where 10.000 events were obtained. The results are provided as dot plots with the relative signal intensity of Annexin V vs. 7-AAD and expressed in percentage.

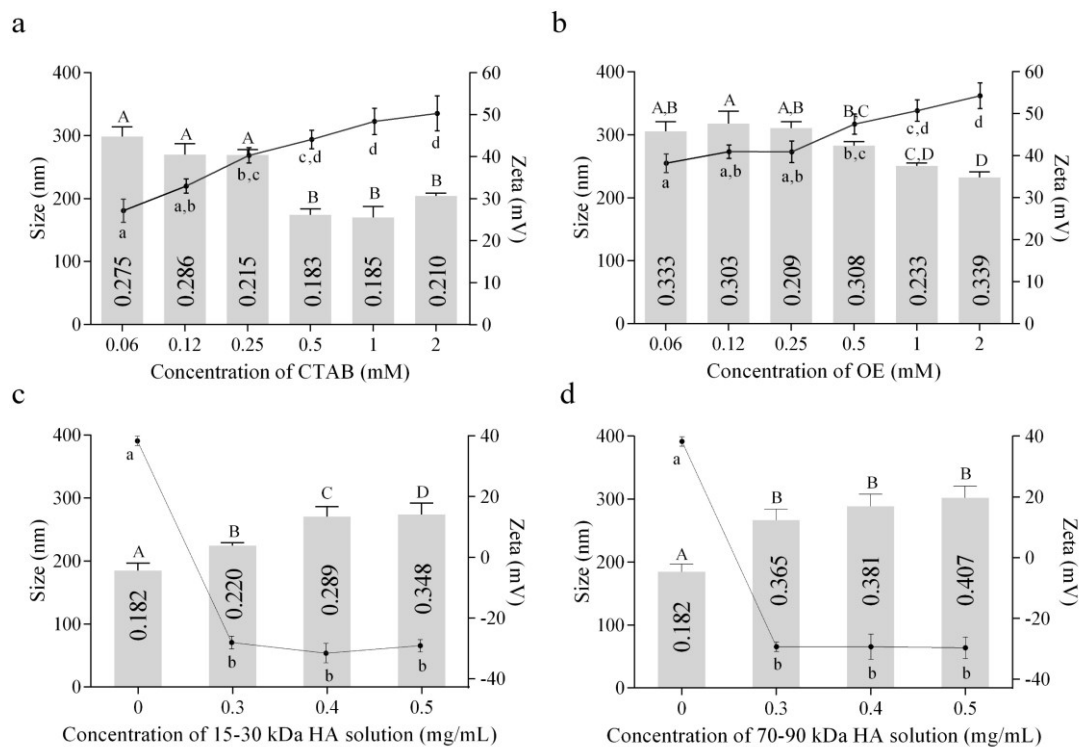
### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Preparation and characterization of the nanoemulsions

In this study, cationic nanoemulsions were prepared by the spontaneous emulsification method. Firstly, the effect of the type (CTAB or OE) and concentration (0.06 to 2 mM) of the cationic surfactant on the droplet size and zeta potential was evaluated. The results showed that an increase in both CTAB (Figure 2.1a) and OE (Fig. 1b) concentration produced a significant decrease in the droplet size from  $298.4 \pm 15.4$  nm to  $170.1 \pm 17.3$  nm and from  $317.7 \pm 19.6$  nm to  $232.1 \pm 8.9$  nm, respectively. The increase of the CTAB and OE concentration, otherwise, led to the increase of the zeta potential values from  $27.1 \pm 2.7$  mV to  $50.33 \pm 4.1$  mV and from  $38.2 \pm 2.2$  mV to  $54.3 \pm 3.0$  mV with, respectively (Figure 2.1a, 2.1b). However, despite their ability to generate nanocarriers displaying positively charged surfaces suited for drug delivery purposes (e.g., gene and cancer therapy), cationic surfactants are potentially toxic compounds [55]. Considering that, the cationic surfactant that produced the smallest droplet size and the highest positively charged surface at the lowest concentration was selected for developing the CUR/MEL-loaded HA-coated nanoemulsions. This goal was achieved by using CTAB at a concentration of 0.5 mM. Subsequently, the HA coating was performed by mixing the NE with a HA acid solution (MW 15–30 or 50–70 kDa) at concentrations ranging from 0.2 to 0.5 mg/mL. At the lowest HA concentration (0.2 mg/mL), the presence of agglomerates in the samples was visualized probably due to the neutralization of the surface charges [23], and therefore droplet size and zeta potential measurements could not be performed. On the other hand, the addition of the HA solution at higher

concentrations led to the inversion of the zeta potential from positive to negative values, indicating the adsorption of HA acid at the droplet surface. The negative zeta potential, in this case, was provided by the ionization of the carboxylic groups of the HA (pKa 3–4) [56] at pH 6.5 and reached the value of around -30 mV, regardless of the HA molecular weight and concentration tested (Figure 2.1c, 2.1d). The presence of a plateau-like shape observed in the zeta potential profiles is indicative of the NE surface saturation or HA ionization saturation as described elsewhere [57]. Also, the presence of HA at the surface of the NE droplets may be verified by the progressive increase in both mean droplet size and PDI. Notwithstanding, the selected formulation for CUR and MEL entrapment studies was that obtained using a solution of 15–30kDa HA at a concentration of 0.3 mg/mL, which displayed the smallest droplet size and PDI ( $224.5 \pm 4.6$  and 0.220, respectively) and negative zeta potential of  $-28.1 \pm 2.1$  mV.

Figure 2. 1. Effect of the concentration of (a) CTAB and (b) OE on the mean droplet size, PDI, and zeta potential values of unloaded cationic nanoemulsions. (c) and (d) Effect of the molecular weight and concentration of hyaluronic acid on the mean droplet size, PDI, and zeta potential of cationic nanoemulsions prepared with 0.5 mM CTAB. Bars and lines represent mean droplet sizes and zeta potential values, respectively. PDI values are shown inside the bars. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3).



Different uppercase and lowercase letters indicate significant differences in the mean droplet size and zeta potential values, respectively (p < 0.05).



The final physicochemical characteristics of unloaded and CUR/MEL-loaded nanoemulsions are summarized in Table 2.1. The addition of CUR and MEL to the formulations did not affect the mean droplet size, PDI, and the zeta potential values of the colloidal dispersions, when compared to the unloaded nanoemulsions. The entrapment efficiency of CUR in all formulations was about 85%, while for MEL it was no more than 32%. The differences in the drug solubility expressed by their Log *P* can explain the difference in the entrapment efficiency values. CUR (Log *P* 3.2) [58] is a more lipophilic drug and, therefore, it is found preferentially associated to the nanoemulsion droplets, while MEL (Log *P* 1.6), presenting higher water solubility (0.1 mg/mL) [59], is preferentially partitioned towards the aqueous phase. On the other hand, the presence of HA at the droplet surface (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>) promoted a significant increase in the MEL entrapment efficiency. This result can be attributed to the MEL affinity for the polar segments of the HA structure increasing drug adsorption at oil/water interface [60,61]. The reduction of the CUR and MEL content by half occurred due to a dilution effect after mixing the nanoemulsion suspension with the HA solution.

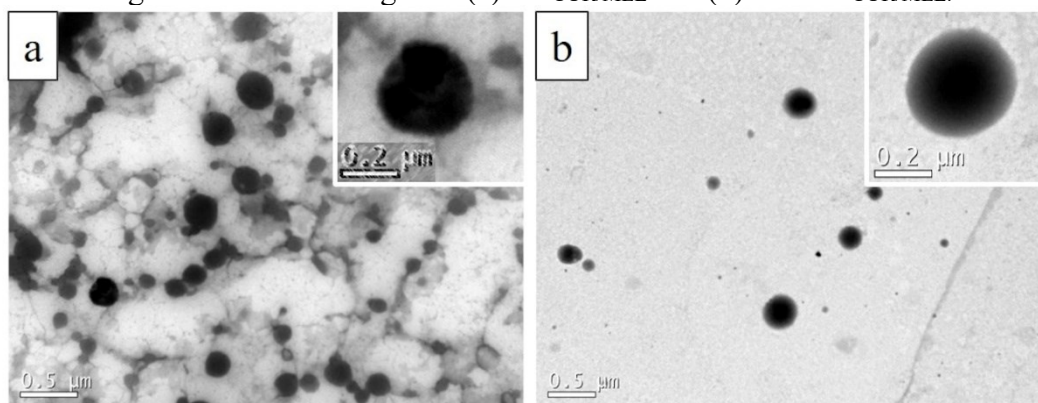
Table 2. 1. Physicochemical properties of unloaded and CUR/MEL-loaded nanoemulsions uncoated and coated with HA. Data represented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

Formulation	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	Drug content ( $\mu\text{g/mL}$ )		Entrapment efficiency (%)	
				CUR	MEL	CUR	MEL
				Unloaded-NE	174.2 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>	0.182 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	39.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
Unloaded-HA-NE	224.5 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	0.220 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	-28.1 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>				
NE <sub>CUR</sub>	184.0 $\pm$ 12.3 <sup>a</sup>	0.190 $\pm$ 0.01	39.4 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	86.2 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>		85.4 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	
HA-NE <sub>CUR</sub>	226.7 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	0.236 $\pm$ 0.01	-28.3 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	43.6 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>		85.5 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	
NE <sub>CUR/MEL</sub>	187.4 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	0.191 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	40.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	86.0 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	490.5 $\pm$ 10.7 <sup>a</sup>	84.5 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	22.1 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>
HA-NE <sub>CUR/MEL</sub>	236.0 $\pm$ 6.1 <sup>b</sup>	0.231 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	-27.4 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	42.5 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	245.7 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>	86.7 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	32.0 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>

Different lowercase letters indicate significant statistical difference ( $p < 0.05$ ).

The TEM images of NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> are shown in Figure 2.2. Both uncoated and HA-coated nanoemulsions displayed spherical shapes with droplet sizes consistent with those obtained by dynamic light scattering. Additionally, a core-shell structure was observed for HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> (Fig. 2.2b), indicating the presence of HA at the surface of the droplets, which, in turn, corroborates with the results obtained in the size and zeta potential measurements of the formulations.

Figure 2. 2. TEM images of (a) NE<sub>CUR/MEL</sub> and (b) HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>.

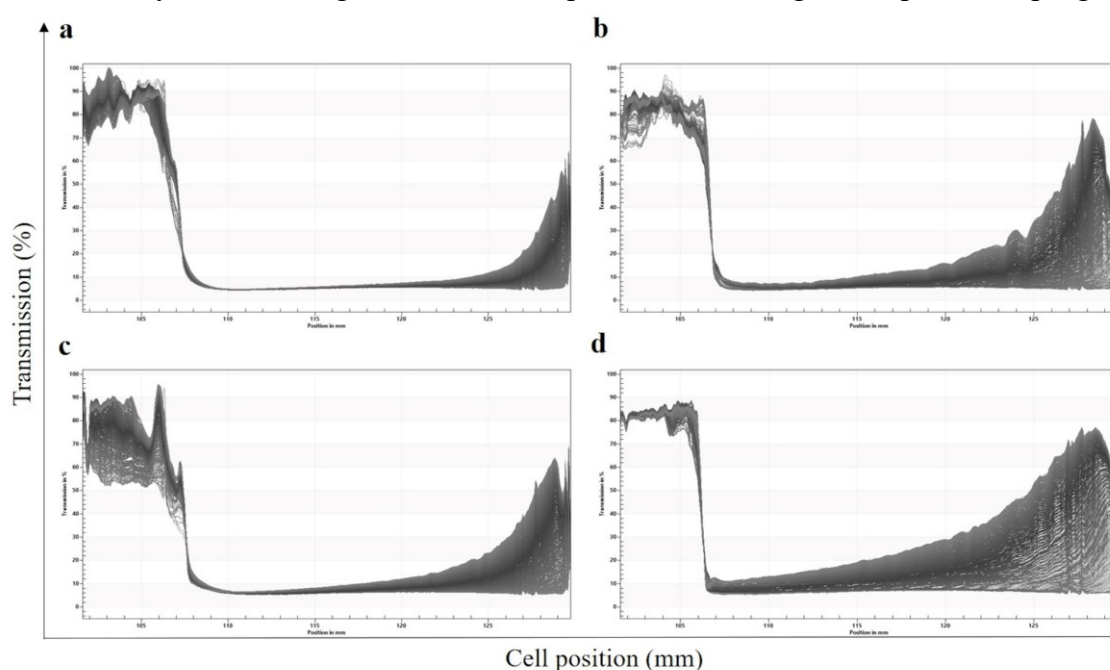


### 3.2. Stability of the nanoemulsions

Nanoemulsions are thermodynamically unstable systems since the free energy required to separate the oil from the water phase is lower than that necessary for emulsification. Nanoemulsions typically break down during storage due to various mechanisms such as gravitational separation, flocculation, coalescence, and Ostwald ripening [62]. In this study, accelerated stability tests using a multisample analytical centrifuge with photometric detection were performed at 25 °C and 4 °C to evaluate the stability of uncoated and HA-coated nanoemulsions. This method is based on measuring the intensity of the transmitted NIR light in a sample being centrifuged at high centrifugal speeds. The kinetics of the nanodroplet separation process is characterized by the shape and progression of the light transmission profiles measured as a function of time and position over the entire sample length [63]. The evolution of transmission profiles obtained for uncoated-NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-coated NE<sub>CUR/MEL</sub> is shown in Figure 2.3. An increase of the light transmission in the cell bottom can be observed, which is a characteristic of a creaming phenomenon. The extent of creaming was expressed by an instability index that quantifies the clarification in transmission based on droplet size and separation at a given time in the presence of accelerated gravitational force, divided by the maximum clarification possible. It is a dimensionless number between 0 and 1, where 0 indicates no separation and hence highest stability, and 1 represents complete segregation of phases and, therefore, lowest stability under the centrifugal field [64]. The instability index was  $0.178 \pm 0.03$  (NE<sub>CUR/MEL</sub>) and  $0.258 \pm 0.02$  (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>) for samples analyzed at 25 °C (Figure 2.3a and Figure 2.3c, respectively) and  $0.062 \pm 0.01$

(NE<sub>CUR/MEL</sub>) and  $0.121 \pm 0.01$  (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>) for samples analyzed at 4 °C (Figure 2.3b and Figure 2.3d, respectively). In this case, the clarification regions observed at 25 °C were broader than those obtained at 4 °C. These results indicated that the creaming rate is faster at a higher temperature. The presence of HA also affected the stability of nanoemulsions since higher instability indexes were obtained for HA-coated nanoemulsions. However, both NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> were considered stable in tested conditions since the instability indexes were lower than 0.3.

Figure 2. 3. Evolution of the light transmission profiles obtained after centrifugation of (a) and (b) NE<sub>CUR/MEL</sub> and (c) and (d) HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> C at 4 °C and 25 °C in a LUMI-Sizer® analytical centrifuge. First recorded profiles bottom right, last profiles top right.



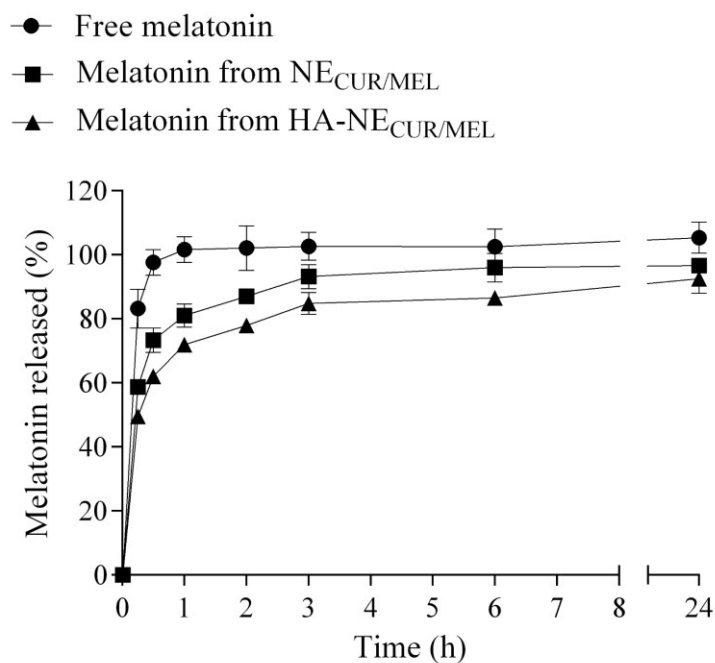
### 3.3. *In vitro* release studies

The release profiles of CUR and MEL from NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> are shown in Figure 2.4. To assess the effect of the dialyses membrane on drug diffusion, release profiles using CUR and MEL ethanol:water (20:80, v/v) solutions were also investigated. Both free drugs were quickly diffused throughout the dialysis bag towards the receptor medium, reaching almost 100% of release in the first 30 min. On the other hand, when NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> were assayed, slower release profiles were obtained, evidencing the ability of the nanoemulsions to control the drugs release. However, substantial differences in the release profiles were verified depending on the

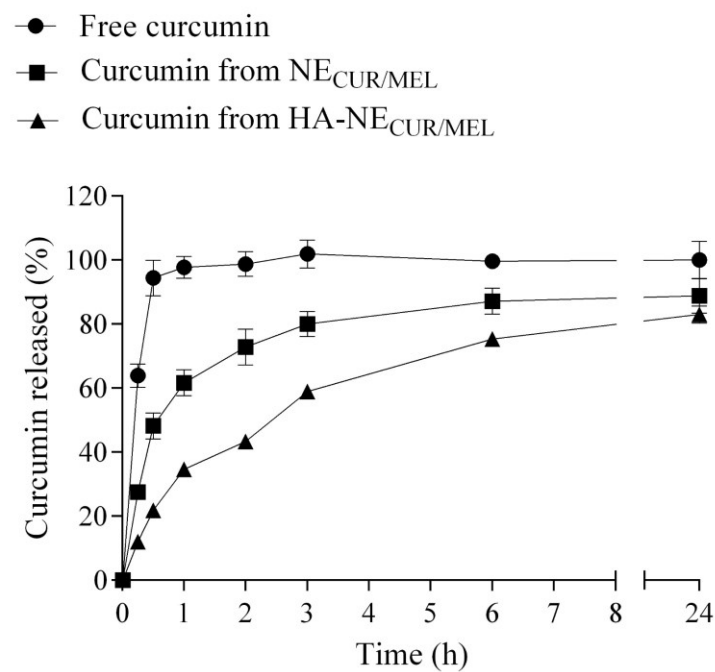
properties of the drug and the nanocarrier. For MEL, a remarkable burst effect occurred since 70% to 80% of drug was released in first hour, regardless of the presence of HA on the droplet surface (Fig. 4a). The burst effect has been attributed to amount of non-entrapped or adsorbed drug onto the particle surface, which is expected to occur for MEL since most of drug is found dissolved in the aqueous phase of the formulations (see Table 1). On the contrary, a more controlled release profile was obtained for CUR, where around 50% and 70% of the drug was released after 3 h from AH-NE<sub>CUR/MEL</sub> and NE<sub>CUR/MEL</sub>, respectively (Figure 2.4b). It is noteworthy that for CUR the presence of HA at the droplet surface contributed for slowing the release rate, indicating that this polymer acted as a barrier for drug diffusion from oil to aqueous phase.

Figure 2. 4. In vitro drug profile obtained for (a) CUR and (b) MEL from  $NE_{CUR/MEL}$  and  $HA-NE_{CUR/MEL}$  in PBS pH 6.5 containing SDS 0.25% (w/v) at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Data represented as mean  $\pm$  SD (n = 3).

a



b



### 3.4. Mucoadhesive properties

The mucoadhesive properties of  $NE_{CUR/MEL}$  and  $HA-NE_{CUR/MEL}$  were firstly evaluated by measuring the zeta potential and droplet size after incubating the nanoemulsions with a mucin dispersion at different concentrations (Table 2.2). The zeta potential of the mucin dispersion at a concentration of 250  $\mu\text{g/mL}$  was  $-11.5 \pm 4.6$  mV, while  $NE_{CUR/MEL}$  and  $HA-NE_{CUR/MEL}$  exhibited zeta potential values of  $38.1 \pm 1.1$  mV and  $-27.8 \pm 2.0$  mV, respectively. When the mucin is added to the uncoated nanoemulsion ( $NE_{CUR/MEL}$ ), an inversion of the charge sign from positive to negative was observed, accompanied by a significant increase in the droplet size. These results indicated that electrostatic interactions occurred between the droplets of the cationic nanoemulsions and the mucin, which is negatively charged at physiological pH [65]. However, the net surface charge was not affected by the increase in the concentration of the mucin dispersion, suggesting that the complete neutralization of the surface charge occurred at the lowest concentration of mucin dispersion tested. When the mucin dispersion was added to  $HA-NE_{CUR/MEL}$ , only a slight increase in the zeta potential in modulus was observed. However, a significant increase in the droplet size was verified. Different from uncoated nanoemulsions,  $HA-NE_{CUR/MEL}$  shows anionic nature due to the presence of ionization of the carboxylic groups of HA. In this case, the mucin interaction results from a physicochemical process, such as hydrophobic interactions, hydrogen bonds, and van der Waals forces, which are controlled by pH and ionic composition [65–67]. The increase in size, however, could be ascribed to a real growth of the individual nanoemulsion droplets due to the adsorbed mucin layer or a mixed contribution of this growth together with a bridging phenomenon between the droplets, giving rise to the formation of aggregates [66]. To evaluate this point, the amount of mucin adsorbed onto the nanoemulsion surface was determined (Table 3). The amount of mucin adsorbed onto the droplet surface increased with the concentration of mucin dispersion, regardless of the formulation. This result suggests that mucin is effectively linked to the HA layer surrounding the droplets of  $HA-NE_{CUR/MEL}$  and attaching to the cationic layer surrounding nanodroplets of  $NE_{CUR/MEL}$ , probably generating an external layer of mucin which determines the new electrokinetic properties of the colloidal system. It is noteworthy that this adsorption is taking place despite electrostatic interaction should be repulsive since both mucin and  $HA-NE_{CUR/MEL}$  display negative zeta potential values.

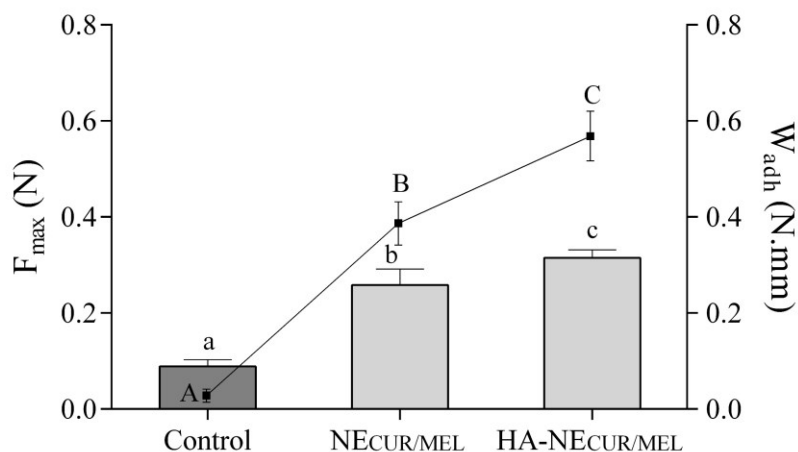
Table 2. 2. Zeta potential values, droplet sizes, and amount of mucin adsorbed onto NECUR/MEL and HA-NECUR/MEL surface after incubation with a mucin dispersion. Data represented as mean  $\pm$  SD (n = 6).

Mucin concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Zeta potential (mV)		Droplet size (nm)		Mucin adsorbed ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	NECUR/MEL	HA-NECUR/MEL	NECUR/MEL	HA-NECUR/MEL	NECUR/MEL	HA-NECUR/MEL
0	38.1 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	-27.8 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	191.8 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	220.8 $\pm$ 10.1 <sup>a</sup>	.	.
100	-13.8 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	-34.0 $\pm$ 2.4 <sup>a, b</sup>	224.4 $\pm$ 11.1 <sup>a</sup>	242.4 $\pm$ 10.3 <sup>a</sup>	33.2 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	26.1 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>
250	-11.8 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	-34.8 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	389.3 $\pm$ 10.7 <sup>b, c</sup>	359.5 $\pm$ 29.8 <sup>b</sup>	111.7 $\pm$ 6.4 <sup>b</sup>	108.2 $\pm$ 14.3 <sup>b</sup>
500	-14.4 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	-33.5 $\pm$ 2.3 <sup>a, b</sup>	345.7 $\pm$ 44.9 <sup>c</sup>	457.9 $\pm$ 56.6 <sup>c</sup>	132.0 $\pm$ 13.9 <sup>b</sup>	202.9 $\pm$ 28.0 <sup>c</sup>

Different lowercase letters in the same column indicate significant statistical differences ( $p < 0.05$ ).

As can see in Figure 2.5, both formulations exhibited mucoadhesive properties as assigned by the higher adhesion work ( $W_{\text{adh}}$ ) and the force ( $F_{\text{max}}$ ) needed to detach HA-NECUR/MEL from the mucin disk when compared with the values obtained for the negative control (buffer) ( $p < 0.05$ ). However,  $W_{\text{adh}}$  and  $F_{\text{max}}$  were significantly higher for HA-NECUR/MEL when compared with NECUR/MEL ( $p < 0.05$ ). This result can be attributed to the abundance of carboxylic groups in HA, resulting in hydrogen bonds as prevalent interfacial forces. Such forces have been considered the most important in the mucoadhesion phenomenon because, although they are individually weak, a great number of interactions can result in an intense global mucoadhesion. In addition, random coil structure in solution of HA contributes to the mucoadhesion process by entanglement with the mucous layer [65].

Figure 2. 5. Detachment force ( $F_{\max}$ , bars) and work of adhesion ( $W_{\text{adh}}$ , lines) of uncoated ( $\text{NE}_{\text{CUR/MEL}}$ ) and HA-coated nanoemulsions ( $\text{HA-NE}_{\text{CUR/MEL}}$ ) obtained by tensile strength method, using a mucin disk as a substrate. Data represented as mean  $\pm$  SD.



Different lowercase and uppercase letters indicate significant differences in  $F_{\max}$  and  $W_{\text{adh}}$ , respectively ( $p < 0.05$ ).

### 3.5. Cytotoxicity studies

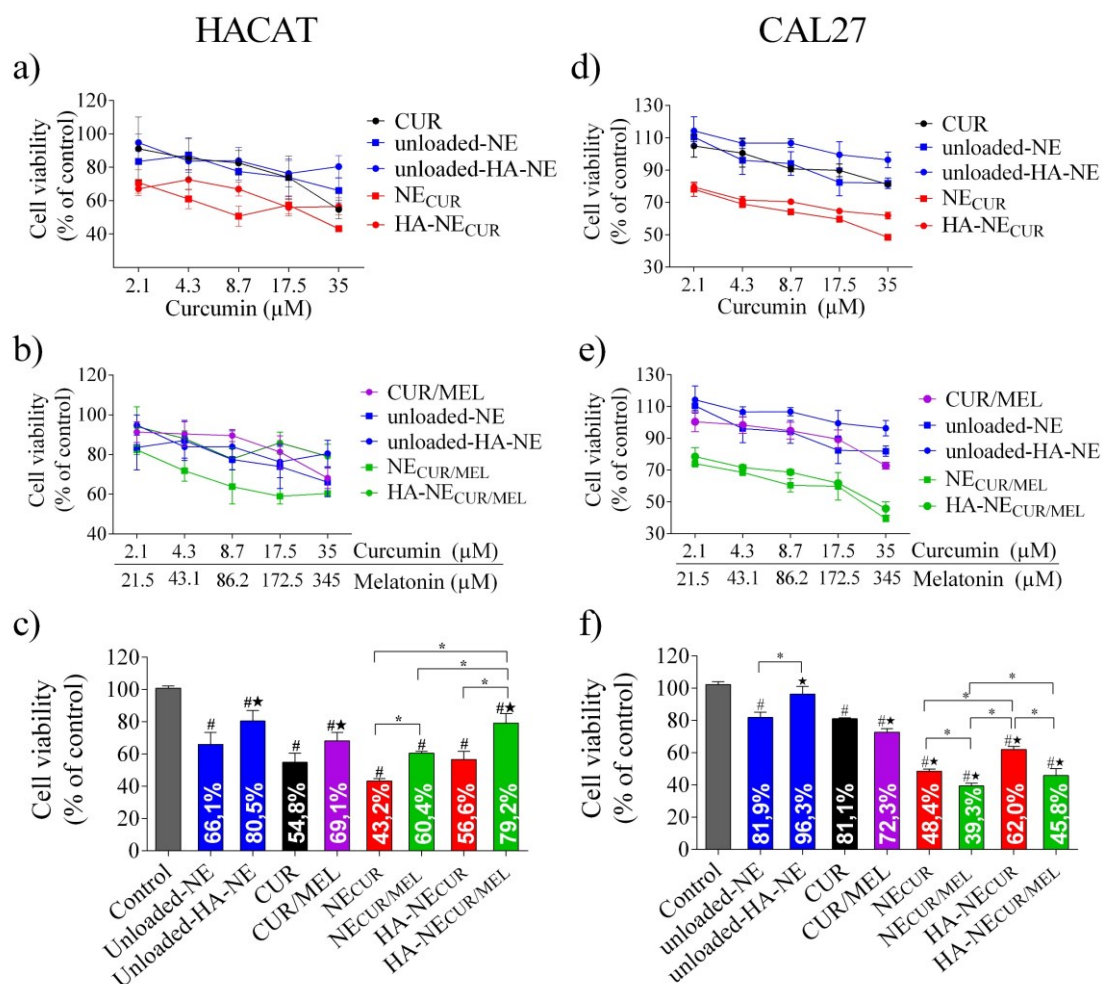
The cytotoxic activity of free drugs (CUR and CUR/MEL) and drug-loaded uncoated ( $\text{NE}_{\text{CUR}}$  and  $\text{NE}_{\text{CUR/MEL}}$ ) and HA-coated nanoemulsions ( $\text{HA-NE}_{\text{CUR}}$  and  $\text{HA-NE}_{\text{CUR/MEL}}$ ) were evaluated on non-tumor cell line HACAT and tumor oral cell line CAL27 by MTT method. For normal cells, all groups tested showed an effect on cell viability in a dose-dependent manner (Figure 2.6a and 2.6b). As expected, CUR was cytotoxic against HACAT as previously demonstrated by Lundvig et al. [68], which describe that CUR induces apoptosis on keratinocytes via a reactive oxygen species (ROS)-dependent mechanism. However, a reduced cytotoxic effect was verified after HACAT incubation with the CUR/MEL combination compared with CUR. While free CUR showed a reduction of around 46% in cell viability, the CUR/MEL combination reduced the cell viability by about 32%. A similar effect was observed for the drug-loaded nanoemulsions (Figure 2.6c). These findings suggest that MEL protects against CUR-induced oxidative keratinocyte damage. Indeed, several studies have shown that MEL stimulates keratinocyte proliferation, decreasing the cytotoxicity of drugs induced by oxidative stress, such as ROS generation in normal cells [69–71]. Considering unloaded nanoemulsion, the HA coating reduced the cytotoxicity against HACAT. These results



agree with previous studies that describe the high cytotoxicity produced by the presence of CTAB on droplets surface on HACAT cells [55,72]. In fact, according to Kalbáčová et al. [73], the HA-CTAB complex suppressed the negative effect of the CTAB surfactant. The ability of the free drugs, unloaded-nanoemulsions, and drug-loaded nanoemulsions to induce apoptosis on HACAT cells was investigated by flow cytometry (Figure 2.7a). When exposed to 30  $\mu$ M CUR and 295  $\mu$ M of MEL, the results revealed that over 75% of the cells underwent apoptosis after 24 h of incubation. However, there was no statistical difference between the treatments, although the combination of CUR and MEL led to a slight decrease in the apoptosis rate (Figure 2.7b).

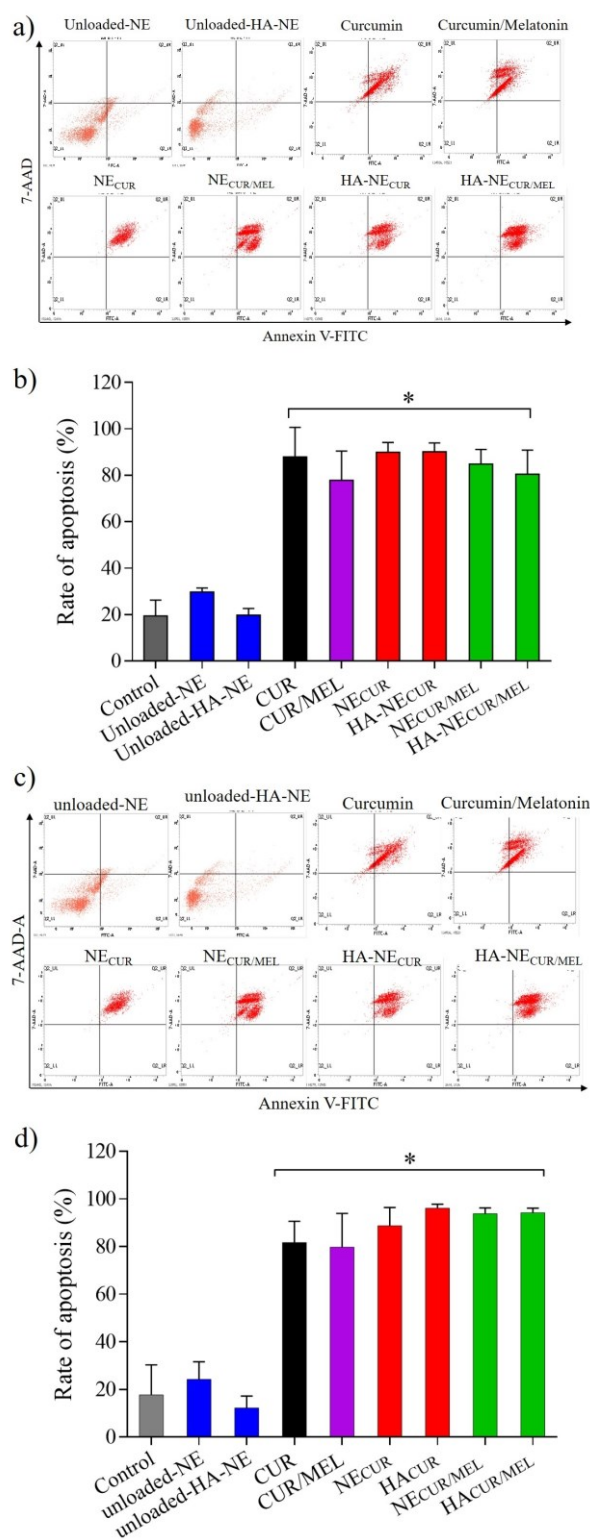
The unloaded nanoemulsions (NE and HA-NE) did not show cytotoxic effects on CAL27 cells (Figure 2.6) (cell viability > 80%). On the other hand, free drugs and CUR and CUR/MEL-loaded nanoemulsions (Figures 2.6d and 2.6e, respectively) caused a significant decrease in cell viability compared to the control group. The cytotoxic effect was higher for CUR and CUR/MEL-loaded nanoemulsions at all concentrations tested than free drugs. Besides, cytotoxicity against CAL27 cells was higher for uncoated nanoemulsions (unloaded-NE, NE<sub>CUR</sub>, and NE<sub>CUR/MEL</sub>) due to the ability of cationic nanocarriers to disrupt the plasma membrane integrity, as demonstrated elsewhere [74]. Moreover, when the highest concentrations of the drugs were tested, the combination of CUR and MEL loaded in nanoemulsions significantly increased the cytotoxicity against CAL27 cells (Figure 2.6f). While cell viability obtained for NE<sub>CUR</sub> and HA-NE<sub>CUR</sub> were  $48.4 \pm 1.3\%$  and  $61.9 \pm 2.0\%$ , the incorporation of MEL to the nanoemulsion formulations (NE<sub>CUR/MEL</sub> and HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>) caused a reduction in cell viability of  $39.3 \pm 1.7\%$  and  $45.8 \pm 4.2\%$ , respectively. The ability of the free drugs, unloaded nanoemulsions, and drug-loaded nanoemulsions to induce apoptosis on CAL27 cells was also investigated (Figure 2.7c). The results revealed that more than 85% of the cells underwent apoptosis after 24 h of treatment (Figure 2.7d). These results demonstrate the benefit of combining CUR and MEL for the treatment of oral cancer in a nanoemulsion formulation. The effect of CUR and MEL combination was also described by Shrestha et al. [42]. These authors demonstrated the MEL synergized the inhibitory effect of CUR against the growth of bladder cancer by enhancing the anti-proliferation, anti-migration, and pro-apoptotic activities. However, studies still need to be carried out to elucidate the mechanisms enclosed in the antitumor activity provided by the combination of CUR and MEL against oral cancer.

Figure 2. 6. Cytotoxicity effect of free drugs, unloaded- and drug loaded nanoemulsions on HACAT (a, b, c) and CAL27 (e, d, f) cell lines. Data were expressed as mean  $\pm$  SD, n = 6. (a) and (d) shows the results obtained with the cells treated with CUR alone; (b) and (e) shows the results obtained with the cells treated with the combination of CUR and MEL; and (c) and (f) shows the results of cell viability obtained after treatment of the cell with 35  $\mu$ M of CUR and 345  $\mu$ M of MEL.



(#) Indicates significant difference between experimental group and control ( $p < 0,05$ ). (★) Indicates significant difference between experimental group and free curcumin ( $p < 0,05$ ). (\*) Indicate significant difference between selected experimental groups ( $p < 0,05$ ).

Figure 2. 7. Flow cytometric analysis of (a,b) HACAT and (c,d) CAL27 cell apoptosis. Cells were treated with free drugs and drug-loaded nanoemulsions at 35  $\mu$ M of CUR and 345  $\mu$ M of MEL for 24 h. (a) and (c) illustrate the original dot plots of the 7-AAD versus the Annexin-V/FITC fluorescence intensities (logarithmic scales).



7-AAD negative/Annexin-V negative cells were considered as non-apoptotic, non-necrotic (lower left quadrant, viable cells), 7-AAD negative/Annexin-V positive cells as early apoptotic (lower right quadrant), 7-AAD positive/Annexin-V positive cells as late apoptotic (upper right quadrant), and 7-AAD positive/Annexin-V negative cells as post-late apoptotic/necrotic (upper left quadrant). (b) and (d) show

the results expressed as rate of apoptosis (the percentage of early + late apoptotic cells). Results were presented as mean  $\pm$  SD (n = 6). \*, p < 0.05, significantly different from control.

#### 4. Conclusions

In this study, cationic and HA-coated nanoemulsions for co-delivering CUR and MEL were successfully developed and characterized aiming the use of this drug combination to locally treat the oral cancer. The mucoadhesive properties of the formulations were demonstrated by the strong ability to interact with the glycoprotein mucin, but a superior mucoadhesive property was evidenced for HA-coated nanoemulsions. In addition, in vitro studies demonstrated that CUR and MEL combination in HA-NE significantly decreased the viability of CAL27 cell line by inducing apoptosis, but showed a protective effect on HACAT cell line. Therefore, HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> may constitute a good strategy for increasing the residence time and delivering CUR and MEL into the oral cavity for adjuvant treatment of oral cancer.

#### Credit author statement

**Edna da Silva Vieira:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Validation, Formal analysis, Writing- Original Draft, Writing- Review & Editing. **Eduarda Talita Bramorski Mohr:** Methodology, Investigation, Formal analysis. **Eduardo Monguilhott Dalmarco:** Resources, Supervision. **Elenara Lemos-Senna:** Conceptualization, Resources, Writing- Review & Editing, Supervision.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

#### Declaration of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- [1] Q.M. Laura, M.D. Chow, Head and neck cancer, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020) 60–72. <https://doi.org/10.1097/00001622-199206000-00007>.
- [2] A.L.S. Galbiatti, J.A. Padovani-Junior, J.V. Maniglia, C.D.S. Rodrigues, É.C. Pavarino, E.M. Goloni-Bertollo, Head and neck cancer: Causes, prevention and treatment, *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 79 (2013) 239–247. <https://doi.org/10.5935/1808-8694.20130041>.
- [3] D.L. Schwartz, D.N. Hayes, The Evolving Role of Radiotherapy for Head and Neck Cancer, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 34 (2020) 91–108. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2019.08.019>.
- [4] C. Rivera, Essentials of oral cancer, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 11884–11894.
- [5] H.A. Hazzah, R.M. Farid, M.M.A. Nasra, M. Zakaria, Y. Gawish, M.A. El-Massik, O.Y. Abdallah, A new approach for treatment of precancerous lesions with curcumin solid–lipid nanoparticle-loaded gels: in vitro and clinical evaluation, *Drug Deliv.* 23 (2016) 1409–1419. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1065524>.
- [6] A.S. Holpuch, G.J. Hummel, M. Tong, G.A. Seghi, P. Pei, P. Ma, R.J. Mumper, S.R. Mallery, Nanoparticles for local drug delivery to the oral mucosa: Proof of principle studies, *Pharm. Res.* 27 (2010) 1224–1236. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0121-y>.
- [7] S. Khan, M. Imran, T.T. Butt, S.W. Ali Shah, M. Sohail, A. Malik, S. Das, H.E. Thu, A. Adam, Z. Hussain, Curcumin based nanomedicines as efficient nanoplatform for treatment of cancer: New developments in reversing cancer drug resistance, rapid internalization, and improved anticancer efficacy, *Trends Food Sci. Technol.* 80 (2018) 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.026>.
- [8] P. Chinna Reddy, K.S.C. Chaitanya, Y. Madhusudan Rao, A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: current status of formulation and evaluation methods., *DARU J. Pharm. Sci.* 19 (2011) 385–403. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-09757-2>.
- [9] A.S. Macedo, P.M. Castro, L. Roque, N.G. Thomé, C.P. Reis, M.E. Pintado, P. Fonte, Novel and revisited approaches in nanoparticle systems for buccal drug delivery, *J. Control. Release.* 320 (2020) 125–141. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.006>.
- [10] S. Surassmo, N. Saengkrit, U.R. Ruktanonchai, K. Suktham, N. Woramongkolchai, T. Wutikhun, S. Puttipipatkachorn, Surface modification of PLGA nanoparticles by carbopol to enhance mucoadhesion and cell internalization, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 130 (2015) 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.015>.

- [11] J.D. Smart, Buccal drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (2005) 507–517. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.3.507>.
- [12] J. Narang, R. Narang, Emerging role of nanoemulsions in oral health management, *Int. J. Pharm. Investig.* 7 (2017) 1. [https://doi.org/10.4103/jphi.jphi\\_32\\_16](https://doi.org/10.4103/jphi.jphi_32_16).
- [13] M.E. Helgeson, Current Opinion in Colloid & Interface Science Colloidal behavior of nanoemulsions : Interactions , structure , and rheology, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 25 (2016) 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.06.006>.
- [14] A. Sasikumar, K. Kamalasanan, Nanomedicine for prostate cancer using nanoemulsion: A review, *J. Control. Release.* 260 (2017) 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.001>.
- [15] E. Sánchez-López, M. Guerra, J. Dias-Ferreira, A. Lopez-Machado, M. Ettcheto, A. Cano, M. Espina, A. Camins, M.L. Garcia, E.B. Souto, Current applications of nanoemulsions in cancer therapeutics, *Nanomaterials.* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/nano9060821>.
- [16] S.N.A. Bukhari, N.L. Roswandi, M. Waqas, H. Habib, F. Hussain, S. Khan, M. Sohail, N.A. Ramli, H.E. Thu, Z. Hussain, Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects, *Int. J. Biol. Macromol.* 120 (2018) 1682–1695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188>.
- [17] S. Tiwari, P. Bahadur, Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 121 (2019) 556–571. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.049>.
- [18] B. Chatterjee, N. Amalina, P. Sengupta, U.K. Mandal, Mucoadhesive polymers and their mode of action: A recent update, *J. Appl. Pharm. Sci.* 7 (2017) 195–203. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70533>.
- [19] X. yan Yang, Y. xia Li, M. Li, L. Zhang, L. xia Feng, N. Zhang, Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer, *Cancer Lett.* 334 (2013) 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.002>.
- [20] J.M. Wickens, H.O. Alsaab, P. Kesharwani, K. Bhise, M.C.I.M. Amin, R.K. Tekade, U. Gupta, A.K. Iyer, Recent advances in hyaluronic acid-decorated nanocarriers for targeted cancer therapy, *Drug Discov. Today.* 22 (2017) 665–680. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.12.009>.
- [21] G. Huang, H. Huang, Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery, *Drug Deliv.* 25 (2018) 766–772. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1450910>.
- [22] M. De La Fuente, B. Seijo, M.J. Alonso, Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (2008)

- 2016–2024. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1077>.
- [23] F.A. Oyarzun-ampuero, G.R. Rivera-rodríguez, M.J. Alonso, D. Torres, Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 4 (2013) 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.05.008>.
- [24] L.M. Tinoco, F.L.O. da Silva, L.A.M. Ferreira, E.A. Leite, G. Carneiro, Hyaluronic acid-coated nanoemulsions loaded with a hydrophobic ion pair of all-trans retinoic acid for improving the anticancer activity, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 54 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000417361>.
- [25] Z. Naz, F.J. Ahmad, Curcumin-loaded colloidal carrier system: Formulation optimization, mechanistic insight, ex vivo and in vivo evaluation, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 4293–4307. <https://doi.org/10.2147/IJN.S82788>.
- [26] V. da S. Santos, A.P.B. Ribeiro, M.H.A. Santana, Solid lipid nanoparticles as carriers for lipophilic compounds for applications in foods, *Food Res. Int.* 122 (2019) 610–626. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.032>.
- [27] A. Bishayee, Natural Products for Cancer Prevention and Therapy: Progress, Pitfalls and Promise, *Proceedings.* 1 (2017) 982. <https://doi.org/10.3390/proceedings1100982>.
- [28] T.P. Sari, B. Mann, R. Kumar, R.R.B. Singh, R. Sharma, M. Bhardwaj, S. Athira, Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.011>.
- [29] S. Prasad, A.K. Tyagi, B.B. Aggarwal, Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice, *Cancer Res. Treat.* 46 (2014) 2–18. <https://doi.org/10.4143/crt.2014.46.1.2>.
- [30] C.F. Chen, C.C. Lu, J.H. Chiang, H.Y. Chiu, J.S. Yang, C.Y. Lee, T. Der Way, H.J. Huang, Synergistic inhibitory effects of cetuximab and curcumin on human cisplatin-resistant oral cancer CAR cells through intrinsic apoptotic process, *Oncol. Lett.* 16 (2018) 6323–6330. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9418>.
- [31] M.M. Lotempio, M.S. Veena, H.L. Steele, B. Ramamurthy, T.S. Ramalingam, A.N. Cohen, R. Chakrabarti, E.S. Srivatsan, M.B. Wang, Curcumin Suppresses Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Cancer Ther. Preclin.* 11 (2005) 6994–7003. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0301>.
- [32] A. Khafif, S. Lev-Ari, A. Vexler, I. Barnea, A. Starr, V. Karaush, S. Haif, R. Ben-Yosef, Curcumin: A potential radio-enhancer in head and neck cancer, *Laryngoscope.* 119 (2009) 2019–2026. <https://doi.org/10.1002/lary.20582>.
- [33] L. Zhen, D. Fan, X. Yi, X. Cao, D. Chen, L. Wang, Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion via EGFR signaling pathways, *Int J Clin Exp Pathol.* 7 (2014) 6438–6446.
- [34] L. Masuelli, E. Di Stefano, M. Fantini, R. Mattera, M. Benvenuto, L.

- Marzocchella, P. Sacchetti, C. Focaccetti, R. Bernardini, I. Tresoldi, V. Izzi, M. Mattei, G.V. Frajese, F. Lista, A. Modesti, R. Bei, Resveratrol potentiates the in vitro and in vivo anti-tumoral effects of curcumin in head and neck carcinomas, *Oncotarget*. 5 (2014) 10745–10762. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2534>.
- [35] F. Ardito, D. Perrone, M. Giuliani, N.F. Testa, L. Lo Muzio, Effects of Curcumin on Squamous Cell Carcinoma of Tongue: An In Vitro Study, *Curr. Top. Med. Chem.* 18 (2018) 233–243. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180412153824>.
- [36] C.-M. Yeh, S.-C. Su, C.-W. Lin, W.-E. Yang, M.-H. Chien, R.J. Reiter, S.-F. Yang, C.-M. Yeh, S.-C. Su, C.-W. Lin, W.-E. Yang, M.-H. Chien, R.J. Reiter, S.-F. Yang, Melatonin as a potential inhibitory agent in head and neck cancer, *Oncotarget*. 8 (2017) 90545–90556. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20079>.
- [37] E. Agathokleous, M. Kitao, E.J. Calabrese, New insights into the role of melatonin in plants and animals, *Chem. Biol. Interact.* 299 (2019) 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.12.008>.
- [38] G. Gerenu, K. Liu, J.E. Chojnacki, J.M. Saathoff, P. Martínez-Martín, G. Perry, X. Zhu, H.G. Lee, S. Zhang, Curcumin/Melatonin Hybrid 5-(4-Hydroxy-phenyl)-3-oxo-pentanoic Acid [2-(5-Methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide Ameliorates AD-Like Pathology in the APP/PS1 Mouse Model, *ACS Chem. Neurosci.* 6 (2015) 1393–1399. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.5b00082>.
- [39] N.N. Gonçalves, R. V Rodrigues, B. V Jardim-Perassi, M.G. Moschetta, J.R. Lopes, J. Colombo, D.A. Zuccari, Molecular markers of angiogenesis and metastasis in lines of oral carcinoma after treatment with melatonin, *Anticancer Agents Med Chem.* 14 (2014) 1302–1311. <https://doi.org/10.2174/1871520614666140812110246>.
- [40] Y.Q. Shen, A. Guerra-Librero, B.I. Fernandez-Gil, J. Florido, S. García-López, L. Martínez-Ruiz, M. Mendivil-Perez, V. Soto-Mercado, D. Acuña-Castroviejo, H. Ortega-Arellano, V. Carriel, M.E. Diaz-Casado, R.J. Reiter, I. Rusanova, A. Nieto, L.C. López, G. Escames, Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: Suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation, *J. Pineal Res.* 64 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.1111/jpi.12461>.
- [41] B.I. Fernandez-gil, A. Guerra-librero, Y. Shen, J. Florido, L. Martínez-ruiz, S. García-lópez, C. Adan, C. Rodríguez-santana, D. Acuña-castroviejo, A. Quiñones-hinojosa, J. Fernández-martínez, A.E.A. Moneim, L.C. López, J.M.R. Ferrer, G. Escames, Melatonin Enhances Cisplatin and Radiation Cytotoxicity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Stimulating, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019) 1–12.
- [42] S. Shrestha, J. Zhu, Q. Wang, X. Du, F. Liu, J. Jiang, J. Song, J. Xing, D. Sun, Q. Hou, Y. Peng, J. Zhao, X. Sun, X. Song, Melatonin potentiates the antitumor effect of curcumin by inhibiting IKK $\kappa$ /NF- $\kappa$ B/COX-2 signaling pathway, *Int. J. Oncol.* 51 (2017) 1249–1260. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4097>.



- [43] K. Bouchemal, S. Briançon, E. Perrier, H. Fessi, Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification : solvent , oil and surfactant optimisation, *Int. J. Pharm.* 280 (2004) 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.016>.
- [44] A. Sze, D. Erickson, L. Ren, D. Li, Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow, *J. Colloid Interface Sci.* 261 (2003) 402–410. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00142-5).
- [45] E. Vieira, E. Lemos-Senna, Application of a New Validated HPLC-PDA Method for Simultaneous Determination of Curcumin and Melatonin in Hyaluronic Acid-Coated Nanoemulsions, *J. Braz. Chem. Soc.* 31 (2020) 467–475. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190205>.
- [46] T. Detloff, T. Sobisch, D. Lerche, Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems), *Powder Technol.* 174 (2007) 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2006.10.021>.
- [47] F.N. Fonseca, A.H. Betti, F.C. Carvalho, M.P.D. Gremião, F.A. Dimer, S.S. Guterres, M.L. Tebaldi, S.M.K. Rates, A.R. Pohlmann, Mucoadhesive amphiphilic methacrylic copolymer-functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules for nose-to-brain delivery of olanzapine, *J. Biomed. Nanotechnol.* 11 (2014) 1472–1481. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2078>.
- [48] M. Mantle, A. Allen, A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain, *Biochem. Soc. Trans.* 6 (1978) 607–609. <https://doi.org/10.1042/bst0060607>.
- [49] P. dos S. Chaves, A.F. Ourique, L.A. Frank, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, R.C.R. Beck, Carvedilol-loaded nanocapsules: Mucoadhesive properties and permeability across the sublingual mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 114 (2017) 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.01.007>.
- [50] M.L. Bruschi, D.S. Jones, H. Panzeri, M.P.D. Gremião, Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 2074–2089. <https://doi.org/10.1002/jps>.
- [51] J.B. Silva, S.B. de S. Ferreira, A.V. Reis, M.T. Cook, M.L. Bruschi, Assessing mucoadhesion in polymer gels: The effect of method type and instrument variables, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 1–19. <https://doi.org/10.3390/polym10030254>.
- [52] N. Thirawong, J. Nunthanid, S. Puttipipatkachorn, P. Sriamornsak, Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An in vitro evaluation using texture analyzer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.01.010>.
- [53] M. Colombo, F. Figueiró, A. de Fraga Dias, H.F. Teixeira, A.M.O. Battastini, L.S. Koester, Kaempferol-loaded mucoadhesive nanoemulsion for intranasal

- administration reduces glioma growth in vitro, *Int. J. Pharm.* 543 (2018) 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.055>.
- [54] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [55] Y. Zhang, B. Newton, E. Lewis, P.P. Fu, R. Kafoury, P.C. Ray, Cytotoxicity of Organic Surface Coating Agents Used for Nanoparticles Synthesis and Stability, *Toxicol Vitr.* 29 (2015) 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10741-014-9462-7.Natural>.
- [56] A. Mero, M. Campisi, Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules, *Polymers (Basel).* 6 (2014) 346–369. <https://doi.org/10.3390/polym6020346>.
- [57] L. Rabinovich-Guilatt, P. Couvreur, G. Lambert, D. Goldstein, S. Benita, C. Dubernet, Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: The case of cationic emulsions, *Chem. Phys. Lipids.* 131 (2004) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.04.003>.
- [58] T. Jiang, W. Liao, C. Charcosset, Recent advances in encapsulation of curcumin in nanoemulsions: A review of encapsulation technologies, bioaccessibility and applications, *Food Res. Int.* (2020) 109035. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109035>.
- [59] S. Filali, C. Bergamelli, M. Lamine Tall, D. Salmon, D. Laleye, C. Dhelens, E. Diouf, C. Pivot, F. Pirot, Formulation, stability testing, and analytical characterization of melatonin-based preparation for clinical trial, *J. Pharm. Anal.* 7 (2017) 237. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.04.001>.
- [60] G. Huang, J. Chen, Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives, *Int. J. Biol. Macromol.* 125 (2019) 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.074>.
- [61] N.C. Pan, J.A. Vignoli, C. Baldo, P.C. Celligoi, Hyaluronic acid: characteristics, microbial production and industrial applications, *Biochem. Biotechnol. Reports.* 2 (2013) 42. <https://doi.org/10.5433/2316-5200.2013v2n4p42>.
- [62] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, Formation and stability of nano-emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 108–109 (2004) 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>.
- [63] T. Sobisch, D. Lerche, Thickener performance traced by multisample analytical centrifugation, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 331 (2008) 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.05.040>.
- [64] M. Yerramilli, S. Ghosh, Long-term stability of sodium caseinate-stabilized nanoemulsions, *J. Food Sci. Technol.* 54 (2017) 82–92. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2438-y>.

- [65] F.C. Carvalho, M.L. Bruschi, R.C. Evangelista, M.P.D. Gremião, Mucoadhesive drug delivery systems, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 46 (2010) 1–17. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_9).
- [66] A. Aguilera-Garrido, J.A. Molina-Bolívar, M.J. Gálvez-Ruiz, F. Galisteo-González, Mucoadhesive properties of liquid lipid nanocapsules enhanced by hyaluronic acid, *J. Mol. Liq.* 296 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111965>.
- [67] B. Samiey, C.H. Cheng, J. Wu, Effects of surfactants on the rate of chemical reactions, *J. Chem.* 2014 (2014) 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/908476>.
- [68] D.M.S. Lundvig, S.W.C. Pennings, K.M. Brouwer, M. Mtaya-Mlangwa, E. Mugonzibwa, A.M. Kuijpers-Jagtman, F.A.D.T.G. Wagener, J.W. Von den Hoff, Cytoprotective responses in HaCaT keratinocytes exposed to high doses of curcumin, *Exp. Cell Res.* 336 (2015) 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.06.002>.
- [69] U.C. Hipler, T.W. Fischer, P. Elsner, HaCaT cell proliferation influenced by melatonin, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16 (2003) 379–385. <https://doi.org/10.1159/000072933>.
- [70] I. Izykowska, M. Cegielski, E. Gebarowska, M. Podhorska-okolow, Effect of Melatonin on Human Keratinocytes and Fibroblasts Subjected to UVA and UVB Radiation In Vitro, In Vivo (Brooklyn). 23 (2009) 739–745.
- [71] P. Dzięgiel, E. Suder, P. Surowiak, Z. Jethon, J. Rabczyński, L. Januszewska, M. Sopel, M. Zabel, Role of exogenous melatonin in reducing the nephrotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat, *J. Pineal Res.* 33 (2002) 95–100. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2002.02902.x>.
- [72] A. Cadete, A. Olivera, M. Besev, P.K. Dhal, L. Gonçalves, A.J. Almeida, G. Bastiat, J.P. Benoit, M. de la Fuente, M. Garcia-Fuentes, M.J. Alonso, D. Torres, Self-assembled hyaluronan nanocapsules for the intracellular delivery of anticancer drugs, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47995-8>.
- [73] M. Kalbáčová, M. Verdánová, F. Mravec, T. Halasová, M. Pekar̃, Effect of CTAB and CTAB in the presence of hyaluronan on selected human cell types, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 460 (2014) 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.048>.
- [74] E. Fröhlich, The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 5577–5591. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>.



**CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS FORMULAÇÕES  
DESENVOLVIDAS NA VIABILIDADE CELULAR, ÍNDICE DE POLARIDADE  
E NOS ESFEROIDES DE LINHAGENS HACAT, SCC9 E CAL27**

---



## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas oral é responsável por aproximadamente 90% de todas as doenças malignas na cavidade oral, colocando o câncer de boca como um dos principais problemas de saúde pública mundial (PRGOMET *et al.*, 2015). Esse tipo de câncer pode ser precedido por lesões orais com potencial de malignização, essas lesões são alterações teciduais que podem assumir o caráter de tumor maligno, a qualquer momento, podendo se manter estáveis por longos períodos de tempo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as lesões orais com potencial de malignização em: leucoplasia, eritroplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa, queilite actínica, fibrose submucosa, líquen plano e atrofia por deficiência de ferro. Dessas, a leucoplasia, queilite actínica e eritroplasia são as mais comuns (SILVA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2009). A leucoplasia se refere a uma placa branca ou acinzentada não removível à raspagem. A eritroplasia é classificada como placa ou mancha vermelha ligeiramente arredondada que pode se associar a leucoplasia. E a queilite actínica, é uma lesão de caráter inflamatório podendo ter coloração branca ou vermelha que acomete o lábio inferior, causada por exposição crônica aos raios solares (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Células epiteliais escamosas normais tem seu crescimento e localização limitados devido a interações com a membrana basal e células estromais adjacentes. A transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês, epithelial-mesenchymal transition) é um fenômeno comum a todos os tumores epiteliais e faz parte do modo como as células neoplásicas se comportam para invadirem o estroma adjacente. Esse processo biológico permite que uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com a membrana basal por meio da sua superfície basal, sofra modificações, moleculares, bioquímicas e morfológicas, que resultam na obtenção de um fenótipo de célula mesenquimal, com aumento da capacidade de migração, invasão e resistência à apoptose (KRISANAPRAKORNKIT; IAMAROON, 2012; RAMOS *et al.*, 2016).

Várias estratégias para terapias antitumorais baseadas em nanotecnologia estão sendo estudadas atualmente, nesse contexto o foco não se concentra apenas no direcionamento e promoção de mecanismos que resultem em morte ou redução da proliferação celular, mas também no controle de outras atividades que contribuam para o agravamento da doença, tais como a capacidade de invasão das células tumorais (YAO *et al.*, 2020). Sendo assim, o uso de compostos bioativos que se apresentam capazes não só

de inibir o crescimento celular, mas também de modular as propriedades de migração podem ser uma alternativa para reduzir os níveis de invasão e metástase, e consequentemente aumentar a sobrevivência dos pacientes com câncer (ARDITO *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2018b; FERNANDEZ-GIL *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2014; KHAFIF *et al.*, 2009; LOTEMPIO *et al.*, 2005; MASUELLI *et al.*, 2014; ZHEN *et al.*, 2014).

Atualmente, uma grande variedade de modelos animais é utilizada para reconstruir tumores primários e metastáticos a fim de utilizá-los como método de triagem para novos candidatos terapêuticos. Porém, seu alto custo, preocupações éticas e dados quantitativos limitados dificultam sua aplicação como método de triagem de alto rendimento. Em contraste, os modelos baseados em cultura de células *in vitro* são simples, rápidos e econômicos (XIN *et al.*, 2019). Convencionalmente, quase todos os ensaios baseados em células usam o modelo tradicional de cultura bidimensional (2D). Nesse modelo as células são cultivadas em um substrato plano e rígido formando uma monocamada celular aderida, o que resulta em mudanças na sua morfologia, comportamento e padrão de expressão gênica. Tudo isso contribui para uma reduzida previsibilidade da eficácia terapêutica da substância testada. Como resultado, apenas 10% dos fármacos selecionados por testes *in vitro* têm sucesso na aplicação clínica (ADCOCK *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2018; NGUYEN; NGUYEN; PHAM, 2016; XIN *et al.*, 2019).

Como alternativa, é possível empregar modelos de cultura celulares tridimensionais (3D), em que seu diferencial consiste em permitir que as células explorem as diferentes dimensões do espaço, aumentando as interações com o ambiente e entre as células (COSTA *et al.*, 2018; EDMONDSON *et al.*, 2014). Quando as células crescem nesse sistema acabam formando estruturas denominadas de esferóides, e esses apresentam em seu interior uma heterogeneidade celular, formação de microambiente e exposição diferencial a diversos fatores como nutrientes e oxigênio. Dessa forma, os ensaios de triagem realizados com modelos 3D mostram-se mais representativos e vantajosos quando comparado à cultura 2D, pois são capazes de mimetizar condições de adesão célula-célula, hipóxia, e gradiente de penetração de drogas, podendo ser usado como suporte antes da utilização de pesquisas em animais (NUNES *et al.*, 2019; ZANONI *et al.*, 2016). Um dos modelos mais clássicos de cultura 3D é o esferóide multicelular, que se baseia na capacidade de adesão homotípica célula-célula, quando a adesão celular ao plástico das garrafas de cultura é impedida. Esse esferóide pode ser obtido após



agregação de uma suspensão de células cultivadas em condições não aderentes (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

Considerando o que foi mencionado até aqui, esse capítulo reúne os resultados obtidos em estudos realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Marcelo Lazzaron Lamers, do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Nesse capítulo analisamos o efeito das formulações desenvolvidas e caracterizadas no Capítulo II em linhagens de células normais HACAT, e tumorais SCC9 (mais agressiva) e CAL27 (menos agressivas). Utilizando o modelo de cultivo 2D foi determinada a atividade citotóxica, internalização celular, bem como a análise da assimetria celular através do índice de polaridade, como forma indireta de obter informações sobre o efeito das formulações na capacidade migratória das células. Ainda, foram obtidas imagens dos esferoides multicelulares formados a partir das linhagens citadas que foram tratados por até 72 h com as formulações foco desse trabalho.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS**

#### **2.1.1 Matérias-primas e reagentes**

Para a preparação das nanoemulsões foram empregados óleo de rícino, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), ácido hialurônico (HA, MW 15–30 kDa), curcumina (CUR,  $\geq 94\%$ ) e melatonina (MEL,  $\geq 98\%$ ), obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), e lecitina de soja (Lipoid S100, 97.5% fosfatidilcolina) adquirida da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, GER). Para os ensaios *in vitro* foram usados soro fetal bovino (SFB), penicilina, hidrocortisona e estreptomicina adquiridos da Gibco - Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA), e sulforodamina B (SRB), ácido tricloroacético e trizma base da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 2.1.2 Cultura de células

As linhagens HACAT (Queratinócito imortalizado humano – BCRJ® CRL – 0341™) e CAL27 (Carcinoma espinocelular oral humano muito diferenciado – ATCC® CRL-2095™) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Gibco, USA) e a linhagem SCC9 (Carcinoma espinocelular oral humano pouco diferenciado – ATCC® CRL-1629™) foi cultivada em meio DMEM/F12 (Gibco, USA). Todos os meios foram suplementados com 10% de SFB, e 1% de penicilina e estreptomicina. Para cultura de células SCC9 também foi adicionado hidrocortisona (400 ng/mL).

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Preparação das nanoemulsões

Nanoemulsões brancas (NE<sub>B</sub>) foram preparadas pelo método da emulsificação espontânea, conforme descrito por Bouchemal *et al.* (2004). Brevemente, uma fase orgânica contendo óleo de rícino (400 mg), lecitina de soja (60 mg) e CTAB (0.05 mM), previamente dissolvidos em 20 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:3, v/v), foi vertida em 40 mL de água sob agitação vigorosa por 10 minutos. A NE foi formada espontaneamente e então submetida à evaporação sob pressão reduzida para remoção dos solventes orgânicos e concentração até volume final desejado. NE contendo somente curcumina (NE<sub>CUR</sub>) e a associação de curcumina e melatonina (NE<sub>CUR/MEL</sub>) foram obtidas pela adição de 2 e 10 mg de CUR e MEL na fase orgânica da formulação, respectivamente. Neste caso, as formulações foram concentradas em rotaevaporador de modo a obter uma concentração teórica de 0,1 mg/mL de CUR e 0,5 mg/mL de MEL. O pH das formulações foi ajustado a cerca de 7 com uma solução de NaOH 0,1 M. Para obtenção das nanoemulsões revestidas com HA, 1 mL de cada uma das formulações foi lentamente gotejado em 1 mL de uma solução de HA 0,3 mg/mL sob agitação vigorosa, obtendo o grupo de formulações denominadas como HA-NE<sub>CUR</sub> e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> quando carregadas com CUR ou CUR/MEL, e HA-NE<sub>B</sub> quando não contendo os fármacos (TINOCO *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2013b).

## 2.2.2 Caracterização das nanoemulsões

### 2.2.2.1 Determinação do tamanho e potencial zeta

As NE foram caracterizadas quanto ao tamanho e potencial zeta utilizando um equipamento Zetasizer Nano ZS<sup>®</sup> (Malvern Instruments, UK). O diâmetro médio e índice de polidispersão das NE foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, em ângulo fixo de 173°, após diluição apropriada das amostras em água ultrapura (Milli-Q<sup>®</sup>, Millipore, EUA). O potencial zeta foi determinado pela técnica de anemometria laser-doppler. Para as medidas do potencial zeta, as amostras foram colocadas em células eletroforéticas, onde um potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir dos valores de mobilidade eletroforética, empregando a equação de Smoluchowski (SZE *et al.*, 2003).

### 2.2.2.2 Determinação do teor e eficiência de encapsulação da CUR e MEL

O teor e eficiência de encapsulação da CUR e MEL nas NE foram determinados após análise das formulações por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme metodologia desenvolvida e validada por Vieira e Lemos-Senna (2020). As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu (Japão) equipado com uma bomba binária LC-20AD, auto amostrador SIL-20AC HT, forno CTO-20A, detector de arranjo de fotodiodos UV-Vis SPD-M20, e software LC Solution. As análises foram realizadas em modo de fase reversa usando uma coluna Phenomenex<sup>®</sup> Luna C18 (150 × 4.6 mm × 5 μm; USA), mantida a 40 °C. As amostras foram eluídas em modo isocrático usando uma fase móvel constituída de acetonitrila, metanol e ácido fórmico 0.1% (v/v) (35:15:50; v/v/v). O volume de injeção foi 10 μL, e a CUR e MEL foram detectadas a 223 e 425, respectivamente. O tempo de corrida foi de 8 minutos. Para as análises de CLAE, uma alíquota de cada uma das formulações foi completamente dissolvida em acetonitrila (concentração total). A eficiência de encapsulação (EE%) foi estimada como sendo a diferença percentual entre a concentração total de CUR e MEL encontrada nas nanoemulsões e a concentração encontrada no sobrenadante obtido após ultracentrifugação das amostras (Optma MX-XP, Beckman Coulter, USA) a 55,000 g

durante 30 min a 25 °C. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  d.p., obtido após análise de três diferentes preparações.

### 2.2.3 Ensaio de viabilidade celular

Para os estudos de viabilidade celular, as células HACAT, SSC9 e CAL27 foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^3$  célula/poço) e mantidas em atmosfera úmida, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Subsequentemente, foram incubadas com diferentes concentrações de CUR (0,03 - 35  $\mu$ M) e MEL (0,34 - 345  $\mu$ M) livre e associadas nas nanoemulsões por 24 h. As células foram igualmente incubadas com volumes equivalentes das formulações não carregadas com CUR e MEL (NE<sub>B</sub>). O grupo controle foi tratado com o veículo utilizado para os fármacos livres (DMSO 0,01%). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico empregando a sulforodamina B (SRB), como previamente descrito (SKEHAN *et al.*, 1990). Resumidamente, após tratamento as células foram fixadas com uma solução de ácido tricloroacético (50%, p/v) e coradas com SRB (0,4%, p/v). A seguir, as placas foram lavadas com uma solução de ácido acético 1% (v/v). A leitura foi realizada a 560 nm por após diluição do corante sulforodamina B em solução de Trizma 10mM em um leitor automático de microplacas Synergy<sup>TM</sup> HT (BIO-TEK INSTRUMENTS, USA).

### 2.2.4 Ensaio de internalização celular

A internalização celular das nanoemulsões revestidas (HA-NE<sub>CUR</sub>) e não revestidas com HA (NE<sub>CUR</sub>) foi avaliada pela medida da fluorescência da CUR após incubação das células CAL27 (CD44+) com as formulações. As células foram plaqueadas (placas de 96 poços,  $2 \times 10^4$  células/poço) e mantidas em atmosfera úmida, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de 24 h as células foram tratadas com NE<sub>CUR</sub> e HA-NE<sub>CUR</sub> e o fármaco livre nas concentrações de 1,5  $\mu$ M e 3  $\mu$ M por 2 horas. Posteriormente as células foram lavadas três vezes com PBS e levadas para medida da fluorescência usando comprimento de onda de excitação e emissão de 490 nm e 525 nm, respectivamente, em multileitora Infinite M200 (TECAN, CHE). O grupo controle foi composto por células não tratadas e HA-NE<sub>B</sub>.

### 2.2.5 Ensaio com esferóide multicelular

As células HACAT, CAL27 e SCC9 foram cultivadas em placas não aderentes revestidas com agarose na densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço para formar os esferóides (FRIEDRICH *et al.*, 2009). Após 24 horas, os esferóides formados foram tratados com as formulações NE<sub>B</sub>, HA-NE<sub>B</sub>, HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>, e com a associação de CUR e MEL livres, em concentrações equivalentes de 0,03, 0,35 ou 3,5  $\mu\text{M}$  de CUR e 0,34, 3,45 ou 34,5  $\mu\text{M}$  de MEL. Após 24, 48 e 72 h de tratamento foram obtidas imagens dos esferóides com um dispositivo de câmera (AxioCam mrm, Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado em um microscópio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Alemanha), usando o Software AXIOVISION (Zeiss, Göttingen, Alemanha). A análise das imagens foi realizada medindo a área das esferas por meio do software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA).

### 2.2.6 Ensaio de polaridade celular

Para o ensaio de polaridade celular, as linhagens HACAT, SCC9 e CAL27 foram cultivadas até atingirem a confluência de 80%. Em seguida, as células foram tratadas com tripsina-EDTA 0,25% e replaqueadas. Após 24 horas, as células foram novamente tripsinizadas e plaqueadas na concentração de  $3 \times 10^4$  células/poço, em placas de 6 poços com o fundo previamente recoberto por colágeno (3 mg/mL), e incubadas por 4 horas. Após esse período, os poços foram lavados com PBS e meio de cultura puro ou meio de cultura contendo os fármacos livres (CUR/MEL) ou a nanoemulsão revestida com ácido hialurônico (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>), nas concentrações correspondentes a 0,35  $\mu\text{M}$  de CUR e 3,45  $\mu\text{M}$  de MEL, foi adicionado. A placa foi então vedada e as células acompanhadas por 24 horas utilizando um dispositivo de câmera (AxioCam mrm, Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado em um microscópio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Alemanha) usando o Software AXIOVISION (Zeiss, Göttingen, Alemanha). O índice de polaridade (IP) foi então estimado como sendo a razão entre o comprimento do maior eixo que intersecta o núcleo (paralelo à direção de movimento), dividido pelo comprimento perpendicular a esse eixo (LAMERS *et al.*, 2011). IP próximos a 1 indicam células com morfologia mais arredondada, enquanto valores superiores indicam morfologias mais alongadas. As medidas foram realizadas analisando as imagens por

meio do software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA) considerando um número de 30 a 60 células por grupo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

Neste trabalho, o desenvolvimento de NE com a associação de CUR e MEL foi realizado com o intuito de avaliar o efeito da associação destes compostos na atividade citotóxica em modelos de cultura de células de câncer oral. As NE foram então revestidas com HA, uma vez que este se liga especificamente ao receptor CD44 superexpresso em certos tumores, como o carcinoma de células escamosas oral (MATTHEOLABAKIS *et al.*, 2015). O desenvolvimento das nanoemulsões é descrito no Capítulo 2 desta tese. Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos na avaliação da atividade citotóxica das diferentes formulações em modelo de cultura de células 2D e 3D, utilizando as linhagens HACAT, CAL27 e SCC9. A Tabela 3.1 sumariza as características físico-químicas e de teor e eficiência de encapsulação das formulações testadas.

Tabela 3. 1. Características físico-químicas e de teor e eficiência de encapsulação da curcumina (CUR) e melatonina (MEL) das nanoemulsões. (n = 3).

Formulação	Tamanho médio (nm)*	Potencial Zeta (mV)	Teor (µg/mL)		Eficiência encapsulação (%)	
			CUR	MEL	CUR	MEL
NE <sub>B</sub>	174,2 ± 9,8 (0,182)	39,0 ± 1,0				
HA-NE <sub>B</sub>	224,5 ± 4,6 (0,220)	-28,1 ± 2,1				
NE <sub>CUR</sub>	184,0 ± 12,3 (0,190)	39,4 ± 1,8	86,2 ± 3,3		85,4 ± 3,1	
HA-NE <sub>CUR</sub>	226,7 ± 5,4 (0,236)	-28,3 ± 2,5	43,6 ± 2,1		85,5 ± 2,1	
NE <sub>CUR/MEL</sub>	187,4 ± 6,4 (0,191)	40,9 ± 1,2	86,0 ± 4,0	490,5 ± 10,7	84,5 ± 3,0	22,1 ± 1,3
HA-NE <sub>CUR/MEL</sub>	236,0 ± 6,1 (0,231)	-27,4 ± 1,5	42,5 ± 2,3	245,7 ± 4,7	86,7 ± 2,1	32,0 ± 1,4

\*Entre parêntesis: índice de polidispersão.

### 3.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O efeito dos fármacos livres e das NE revestidas ou não com HA sobre a viabilidade celular frente às linhagens HACAT, SCC9 e CAL27, após 24 horas de incubação, é mostrado na Figura 3.1. Conforme pode ser observado, a incubação das células HACAT com os fármacos livres nas menores concentrações testadas (até 3,5  $\mu\text{M}$  de CUR e 34,5  $\mu\text{M}$  de MEL) resultou em uma viabilidade celular acima de 80%. Quando concentrações maiores foram testadas (35  $\mu\text{M}$  de CUR e 345  $\mu\text{M}$  de MEL), a viabilidade celular não foi maior que 30% para a CUR e CUR/MEL livres, diferentemente da MEL livre que manteve a viabilidade celular em valores acima de 70% (Figura 3.1a). Esses dados ressaltam que a linhagem saudável HACAT apresenta maior sensibilidade à CUR quando comparada à MEL, como já descrito por outros autores (CAMPOS *et al.*, 2017; IZYKOWSKA *et al.*, 2009; LUNDVIG *et al.*, 2015). Para as NE contendo os fármacos, uma alta atividade citotóxica frente às células HACAT foi verificada desde as menores concentrações testadas. Este resultado pode ser atribuído, em parte, à presença da CUR nas formulações, assim como do lipídeo catiônico empregado (CTAB), visto que a citotoxicidade também foi observada após incubação das células com as nanoemulsões brancas. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que evidenciaram a sensibilidade da linhagem HACAT a diferentes surfactantes, incluindo o CTAB (MAUPAS *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015a).

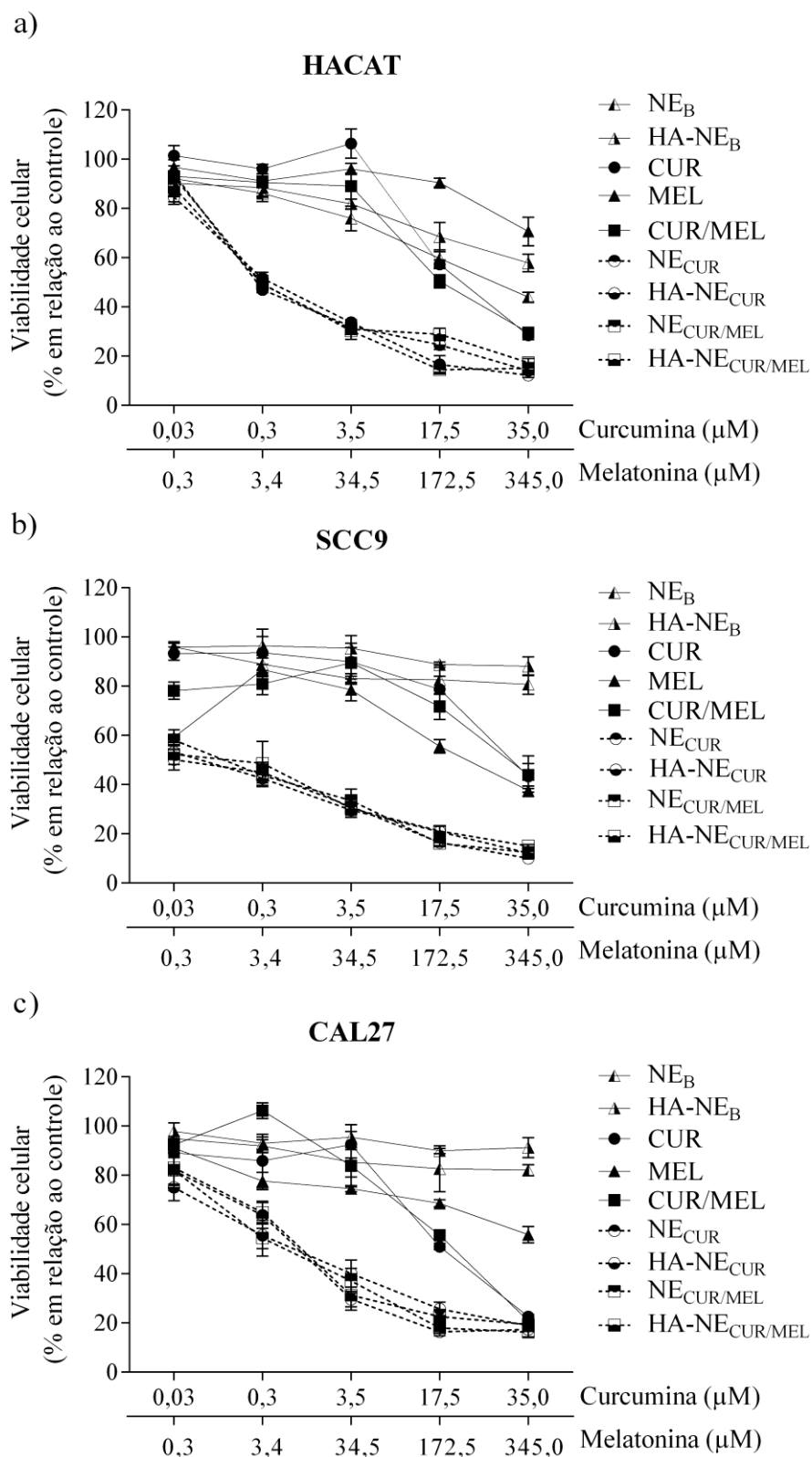
Para as linhagens tumorais SCC9 e CAL27, os fármacos livres também apresentaram citotoxicidade nas doses testadas, estando de acordo com estudos anteriores (FAN *et al.*, 2018; FERNANDEZ-GIL *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020). Apesar da associação de CUR e MEL não ter demonstrado atividade citotóxica superior aos fármacos isolados, nota-se que a linhagem mais agressiva SCC9 (Figura 3.1b) foi mais sensível à MEL, quando comparada à linhagem menos agressiva CAL27 (Figura 3.1c). Neste caso, a maior dose testada de MEL (345  $\mu\text{M}$ ) resultou na redução da viabilidade celular em cerca de 65% para a linhagem SCC9, enquanto esta redução foi de cerca de 45% para a linhagem CAL27.

Quando as NE revestidas e não revestidas com HA foram testadas (NE<sub>CUR</sub>, HA-NE<sub>CUR</sub>, NE<sub>CUR/MEL</sub> e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>), um maior efeito citotóxico frente às três linhagens celulares foi observado, quando comparado aos fármacos livres (Figura 3.1). O efeito citotóxico frente às células CAL27 e SCC9 foi menor para as nanoemulsões brancas

(NE<sub>B</sub>), as quais mantiveram uma viabilidade celular superior a 80%, indicando que o efeito observado sobre estas células com a incubação com as NE carregadas é decorrente da presença dos fármacos nas formulações (Figuras 3.1b e 13.c). No entanto, não foi verificado diferença estatística após o tratamento das células com as NE não revestidas (NE<sub>CUR</sub> e NE<sub>CUR/MEL</sub>) e revestidas com ácido HA (HA-NE<sub>CUR</sub> e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>). Isso pode ter sido causado em virtude de uma possível baixa interação entre o HA e os receptores CD44, uma vez que esse processo depende de alguns fatores, tais como peso molecular do polímero (ZHONG *et al.*, 2019). Além disso, a interação do lipídeo catiônico nas nanoemulsões não revestidas com os fosfolipídeos da membrana plasmática pode ter contribuído para a elevada citotoxicidade destas formulações, aumentando sua internalização nas células (TEIXEIRA *et al.*, 2017).



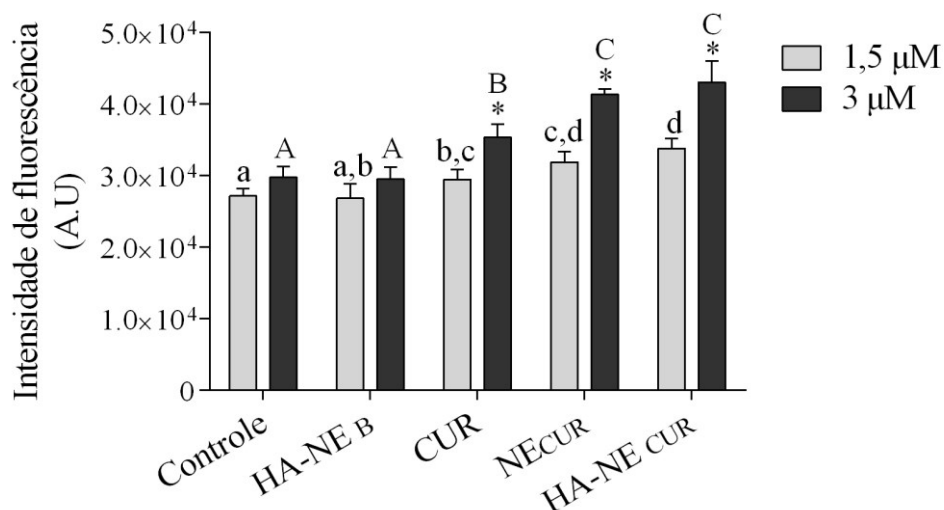
Figura 3. 1. Resultados obtidos na avaliação da viabilidade celular após 24 horas de tratamento com os fármacos livres e as nanoemulsões em linhagem (a) HACAT, (b) SCC9 e (c) CAL27. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=6).



### 3.3 ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR

Com intuito de verificar o efeito do revestimento das NE com HA sobre a atividade citotóxica das formulações, estudos de internalização celular foram realizados com a linhagem CAL27, usando a CUR como marcador fluorescente. Conforme ilustrado na Figura 3.2, a intensidade de fluorescência medida nas células aumentou de forma significativa com o aumento da concentração de CUR testada. Igualmente é possível visualizar que a intensidade de fluorescência foi menor após incubação das células com a CUR livre, quando comparada às NE, na concentração de 3  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). No entanto, não foi verificada diferença estatística na intensidade de fluorescência obtida nas células após incubação com a  $\text{NE}_{\text{CUR}}$  e  $\text{HA-NE}_{\text{CUR}}$  em todas as concentrações testadas. Este resultado está de acordo com aqueles obtidos no ensaio de viabilidade celular, evidenciando que as NE aumentam a atividade citotóxica da CUR, independentemente da presença do revestimento nas formulações.

Figura 3. 2. Resultados obtidos nos estudos de internalização celular após a incubação das células CAL27 com curcumina (CUR) livre e nanoemulsões, na concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$ . Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).



(\*) Indicam diferença estatística na mesma formulação em função da concentração testada ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os diferentes grupos quando testados na concentração de 1,5  $\mu\text{M}$  de curcumina ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os diferentes grupos quando testados na concentração de 3  $\mu\text{M}$  de curcumina ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 ENSAIOS COM ESFERÓIDE MULTICELULAR

Os esferoides multicelulares são sistemas *in vitro* clássicos que podem servir de suporte aos ensaios *in vivo* por representarem de forma mais fiel alguns dos eventos biológicos comuns em diferentes células, quando comparado ao modelo tradicional de cultura 2D. A análise de esferoides tratados com fármacos de interesse pode fornecer informações a respeito da adesão celular e capacidade de penetração do fármaco, por exemplo, que podem ser relacionados com a atividade citotóxica da substância testada. Um dos grandes problemas associados ao tratamento de câncer se relaciona a toxicidade às células saudáveis e tumorais de forma indiscriminada. Por essa razão, esse estudo teve início verificando o efeito das formulações NE<sub>B</sub> e HA-NE<sub>B</sub> em diferentes concentrações durante 72 h de tratamento (Figura 3.3). Esse ensaio aconteceu após 24 h ao plaqueamento das células em matriz não aderente, sendo o tempo 0 (zero) referente a essa etapa que antecede o tratamento. No grupo controle (não tratado) verificamos que com o decorrer do tempo o agregado celular assume uma forma mais compactada, em virtude de uma maior organização e estabelecimento de adesão celular (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015). Os dados referentes a essa ocorrência podem ser melhor visualizados na Tabela 3.2, que exhibe as variações de tamanho dos esferoides em relação aos valores obtidos no tempo 0 (zero).

Conforme mostrado na Tabela 3.2, o processo de redução do volume ocupado pelo esferóide é afetado com o aumento da concentração das nanoemulsões brancas. Este resultado é principalmente percebido quando a NE<sub>B</sub> foi testada na maior concentração, onde um aumento de tamanho do esferóide em cerca de 24% foi observado. A maior área relativa ocupada pelo esferóide indica que a formulação foi capaz de penetrar e que essa dispersão celular ocorre devido à perda de coesão entre as células, sugerindo toxicidade da NE<sub>B</sub> frente às células HACAT.

Figura 3. 3. Imagens representativas dos esferoides de HACAT antes e depois de 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com  $NE_B$  e  $HA-NE_B$  em concentrações equivalentes a quantidade de CUR (a)  $0,03 \mu M$  (b)  $0,3 \mu M$  (c)  $3,5 \mu M$  (d)  $17,5 \mu M$  and (e)  $35,0 \mu M$ .

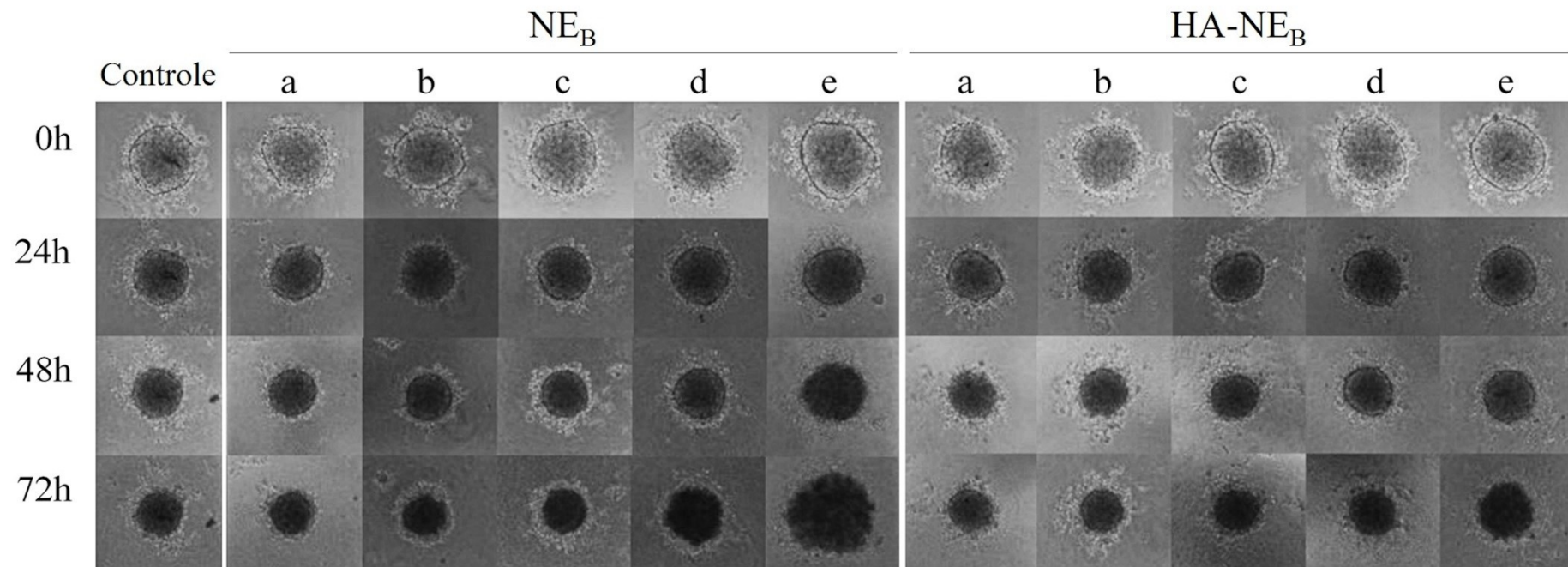


Tabela 3. 2. Variação na área do esferóide de HACAT expressa como tamanho relativo ao tempo 0 h do respectivo esferóide, após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com NEB e HA-NEB em concentrações equivalentes a quantidade de CUR (a) 0,03  $\mu\text{M}$  (b) 0,3  $\mu\text{M}$  (c) 3,5  $\mu\text{M}$  (d) 17,5  $\mu\text{M}$  e (e) 35,0  $\mu\text{M}$ . Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Tempo (horas)	Tamanho do esferóide relativo ao tempo 0 (%)										
	Controle	NE <sub>B</sub>					HA-NE <sub>B</sub>				
		a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
0	100 $\pm$	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0,7 <sup>1</sup>	$\pm 2,6^1$	$\pm 5,5^1$	$\pm 1,8^1$	$\pm 3,6^1$	$\pm 3,1^1$	$\pm 2,9^1$	$\pm 3,5^1$	$\pm 2,5^1$	$\pm 4,9^1$	$\pm 2,3^1$
24	69,4	66,3	68,8	59,6	64,2	57,2	64,9	63,2	59,9	61,3	62,2
	$\pm 2,7^2$	$\pm 5,6^2$	$\pm 2,6^2$	$\pm 2,6^2$	$\pm 1,8^2$	$\pm 2,7^2$	$\pm 2,5^2$	$\pm 0,8^2$	$\pm 1,3^2$	$\pm 1,7^2$	$\pm 3,1^2$
48	55,7	52,0	51,2	47,9	53,1	58,5	54,5	47,1	49,6	44,5	49,7
	$\pm 2,1^3$	$\pm 1,8^3$	$\pm 1,3^3$	$\pm 1,6^3$	$\pm 0,9^3$	$\pm 2,3^2$	$\pm 3,7^3$	$\pm 1,5^3$	$\pm 2,2^3$	$\pm 1,0^3$	$\pm 1,8^3$
72	47,7	44,4	46,2	44,4	61,5	<b>124,1</b>	46,0	41,9	43,7	39,9	59,5
	$\pm 1,6^4$	$\pm 1,0^3$	$\pm 5,8^3$	$\pm 2,8^3$	$\pm 3,3^2$	<b><math>\pm 5,0^3</math></b>	$\pm 1,8^4$	$\pm 1,6^3$	$\pm 1,4^4$	$\pm 1,3^3$	$\pm 0,6^2$

Diferentes números na mesma coluna indicam diferença estatística entre o tamanho dos esferoides em função do tempo ( $p < 0,05$ ).

Considerando a resposta da HACAT à formulação NE<sub>B</sub> e a ausência de diferença estatística no ensaio de citotoxicidade 2D verificada para a associação dos fármacos, optou-se por continuar os estudos nos esferoides com os fármacos CUR/MEL livres e a nanoemulsão HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>. Os esferoides de HACAT, SCC9 e CAL27 foram tratados conforme descrito anteriormente, utilizando as 3 menores concentrações empregadas no estudo de citotoxicidade. Na Figura 3.4 é possível observar que a linhagem SCC9 forma esferoides menos homogêneos, enquanto HACAT e CAL27 formam esferas mais coesivas. Esse fato pode ser justificado por mudanças intrínsecas nas propriedades de adesão célula-célula da SCC9, como uma maior proporção de N-caderina em relação a E-caderina, diferentemente do que é observado para a CAL27 (JI *et al.*, 2005; MATTE *et al.*, 2019). Após 24 h de tratamento, para ambas linhagens tumorais a formulação HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> na maior concentração testada (3,5  $\mu\text{M}$  de CUR e 34,5  $\mu\text{M}$  de MEL) promoveu o aumento na área dos esferoides pela perda de coesão entre as células, resultado que pode ser melhor visualizado na Tabela 3.3.

Figura 3. 4. Imagens representativas dos esferoides de HACAT, SCC9 e CAL27 antes e depois de 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com CUR/MEL e HA-NECUR/MEL nas concentrações de (a) 0,03  $\mu\text{M}$  de CUR e 0,3  $\mu\text{M}$  de MEL, (b) 0,3  $\mu\text{M}$  de CUR e 3,4  $\mu\text{M}$  de MEL e (c) 3,5  $\mu\text{M}$  de CUR e 34,5  $\mu\text{M}$  de MEL.

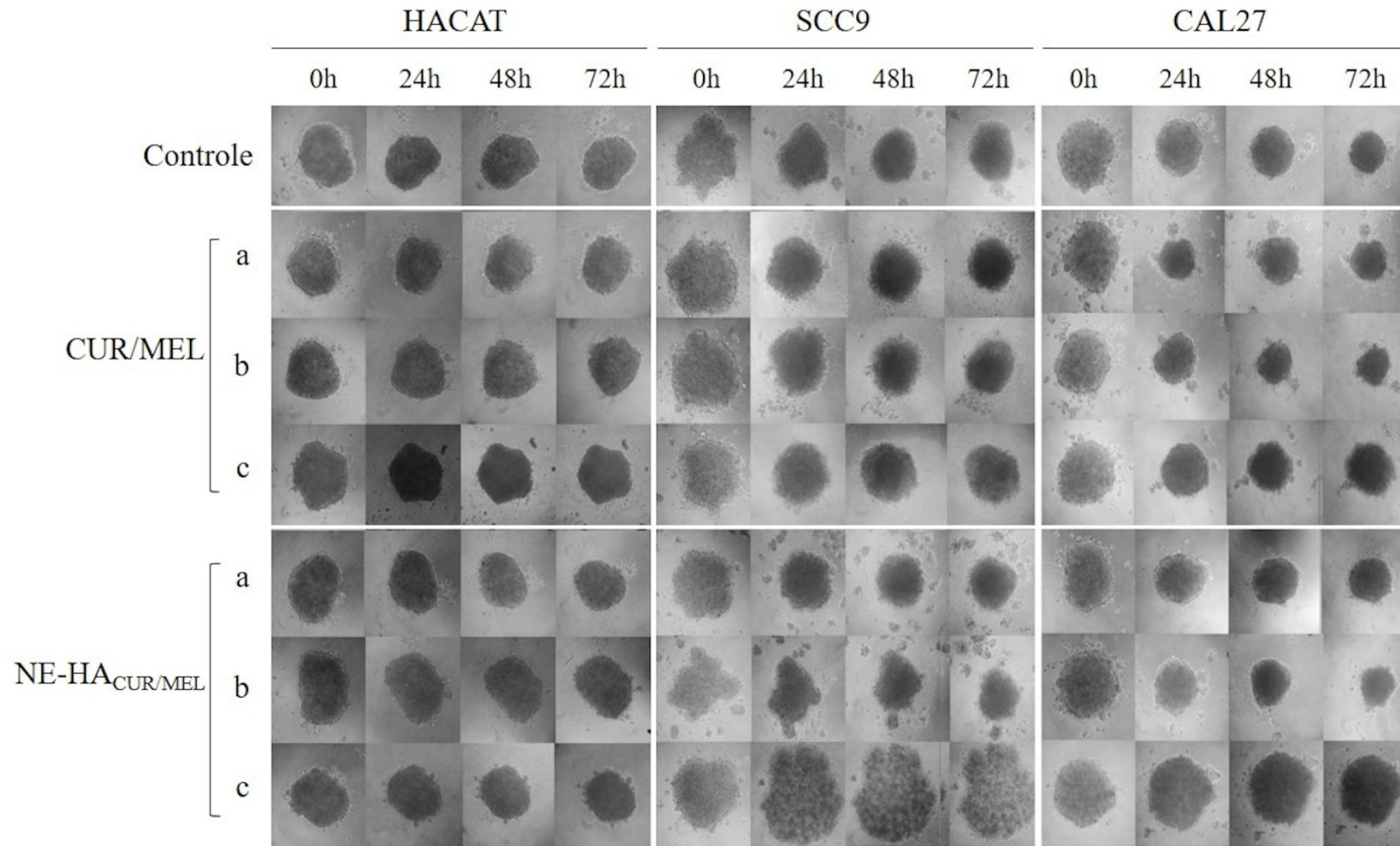


Tabela 3. 3. Variação na área do esferóide de HACAT, SCC9 e CAL27 expressa como tamanho relativo ao tempo 0 h do respectivo esferóide, após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com CUR/MEL e HA-NECUR/MEL nas concentrações de (a) 0,03  $\mu\text{M}$  de CUR e 0,3  $\mu\text{M}$  de MEL, (b) 0,3  $\mu\text{M}$  de CUR e 3,4  $\mu\text{M}$  de MEL e (c) 3,5  $\mu\text{M}$  de CUR e 34,5  $\mu\text{M}$  de MEL.

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

	Tempo (horas)	Tamanho do esferóide relativo ao tempo 0 (%)						
		Controle	CUR/MEL			HA-NE <sub>CUR/MEL</sub>		
			a	b	c	a	b	c
HACAT	0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		$\pm 2,6^1$	$\pm 3,0^1$	$\pm 1,2^1$	$\pm 2,8^1$	$\pm 2,3^1$	$\pm 1,5^1$	$\pm 1,9^1$
	24	79,8	91,2	106,4	91,4	86,0	95,0	90,3
		$\pm 1,5^2$	$\pm 2,8^2$	$\pm 2,9^2$	$\pm 2,3^2$	$\pm 1,5^2$	$\pm 1,8^2$	$\pm 1,9^2$
	48	88,1	90,7	102,2	88,3	74,4	83,8	77,6
		$\pm 2,1^3$	$\pm 2,4^2$	$\pm 2,5^{1,2}$	$\pm 1,1^2$	$\pm 2,2^3$	$\pm 1,9^3$	$\pm 1,3^3$
	72	83,8	91,6	87,5	82,3	69,1	80,3	76,7
		$\pm 2,5^4$	$\pm 3,5^2$	$\pm 4,0^3$	$\pm 2,1^3$	$\pm 3,9^4$	$\pm 3,1^3$	$\pm 5,2^3$
SCC9	0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		$\pm 3,4^1$	$\pm 2,6^1$	$\pm 3,8^1$	$\pm 2,9^1$	$\pm 3,4^1$	$\pm 2,2^1$	$\pm 2,9^1$
	24	70,4	63,1	78,9	71,9	73,2	80,4	<b>170,8</b>
		$\pm 4,0^2$	$\pm 2,7^2$	$\pm 1,9^2$	$\pm 2,7^2$	$\pm 2,4^2$	$\pm 2,2^2$	<b><math>\pm 3,2^2</math></b>
	48	55,6	56,7	53,8	69,1	60,4	65,6	<b>174,7</b>
		$\pm 2,3^3$	$\pm 1,0^3$	$\pm 1,5^3$	$\pm 2,0^{2,3}$	$\pm 2,1^3$	$\pm 2,3^3$	<b><math>\pm 3,9^2</math></b>
	72	59,6	44,9	48,2	65,2	55,8	53,6	<b>157,9</b>
		$\pm 1,3^3$	$\pm 1,5^4$	$\pm 1,8^4$	$\pm 2,3^3$	$\pm 0,6^4$	$\pm 1,9^4$	<b><math>\pm 6,0^3</math></b>
CAL27	0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		$\pm 3,3^1$	$\pm 5,1^1$	$\pm 3,0^1$	$\pm 3,3^1$	$\pm 3,8^1$	$\pm 3,2^1$	$\pm 4,0^1$
	24	70,9	40,3	57,7	66,6	75,3	63,1	<b>117,7</b>
		$\pm 2,0^2$	$\pm 3,4^2$	$\pm 2,5^2$	$\pm 1,5^2$	$\pm 2,4^2$	$\pm 1,9^2$	<b><math>\pm 3,9^2</math></b>
	48	57,1	54,6	41,8	61,4	60,8	47,3	<b>118,4</b>
		$\pm 2,8^3$	$\pm 3,5^3$	$\pm 2,4^3$	$\pm 2,5^3$	$\pm 3,3^3$	$\pm 2,1^3$	<b><math>\pm 3,5^2</math></b>
	72	39,2	41,5	35,3	67,0	50,7	38,5	<b>112,3</b>
		$\pm 1,7^4$	$\pm 2,0^2$	$\pm 2,3^4$	$\pm 3,2^2$	$\pm 1,8^4$	$\pm 2,3^4$	<b><math>\pm 4,6^2</math></b>

Diferentes números na mesma coluna indicam diferença estatística entre o tamanho dos esferóides em função do tempo ( $p < 0,05$ ).

Na Tabela 3.3 é possível observar um aumento de cerca de 70% no tamanho dos esferóides SCC9 e cerca de 15% nos esferóides de CAL27 tratados com HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> (maior dose). O tratamento com HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> induziu claramente a desagregação do esferóide SCC9, sugerindo toxicidade. Em contrapartida, a integridade dos esferóides de HACAT não foram

afetados em nenhuma concentração testada. Esses resultados indicam que baixas concentrações de CUR e MEL associadas à HA-NE são capazes de modificar a adesão célula-célula de tumores esferoides menos (CAL27) e mais (SCC9) agressivos levando a uma diminuição da sua integridade, sem afetar a adesão das células epiteliais não tumorais (HACAT).

### 3.5 ENSAIO DE POLARIZAÇÃO CELULAR

Considerando a metástase como a principal causa de morte provocada por tumores sólidos, é relevante entender os processos envolvidos na sua ocorrência. Os eventos de invasão e migração são passos necessários à formação de metástase e por essa razão são focados em muitos estudos. A migração celular é um fenômeno cíclico que tem como uma de suas etapas a ativação coordenada de moléculas estruturais e de sinalização, as quais vão determinar uma assimetria espacial, gerando uma morfologia polarizada (ETIENNE-MANNEVILLE, 2008; LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996). Considerando a assimetria espacial típica de células polarizadas e sua relação com o perfil migratório, o IP foi calculado para as células SCC9 e CAL27 tratadas com CUR/MEL e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> na concentração correspondente a 0,35  $\mu\text{M}$  de CUR e 3,45  $\mu\text{M}$  de MEL. Os resultados obtidos encontram-se mostrados na Figura 3.5.

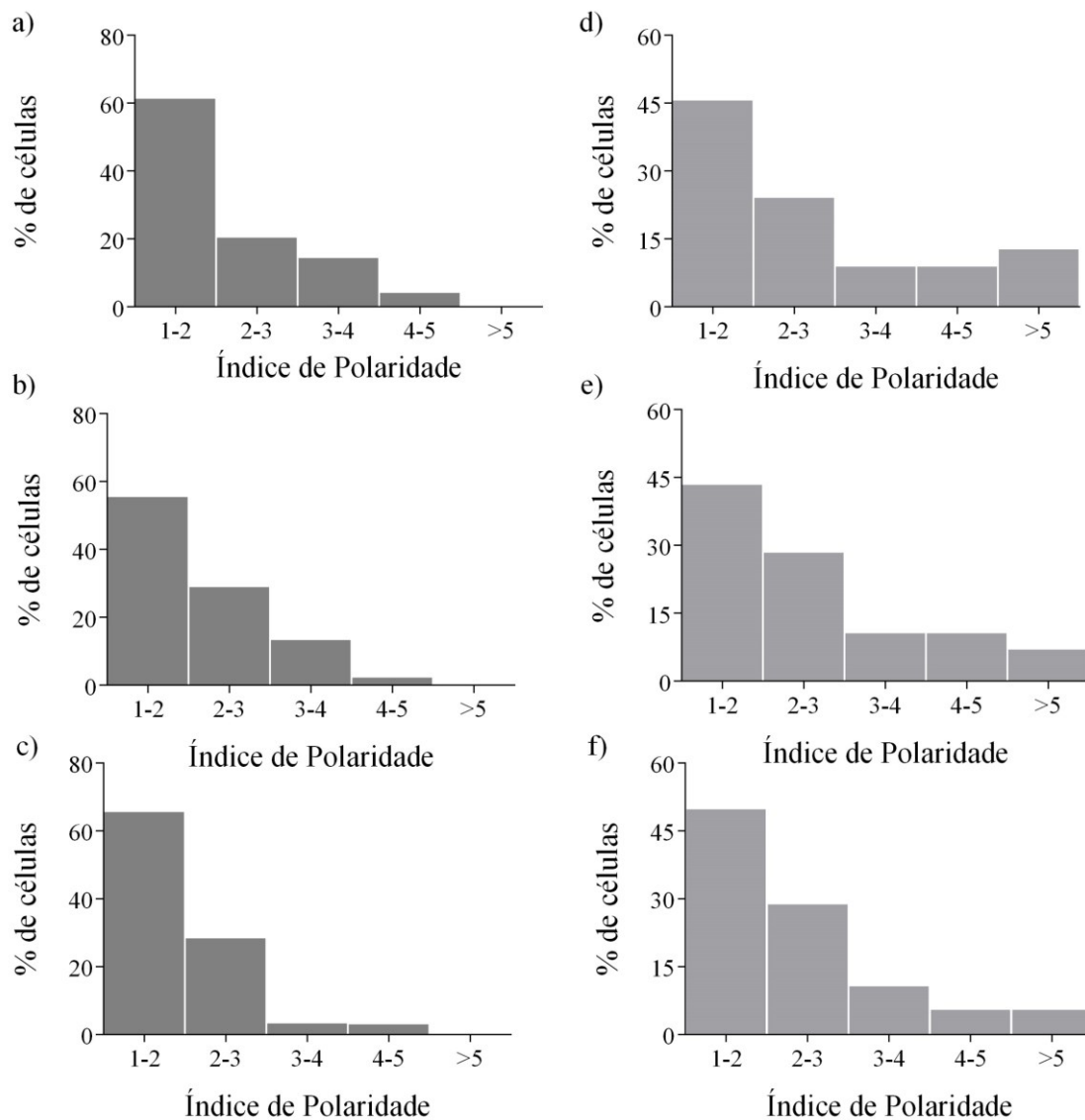
Para a linhagem CAL27 (Figura 3.5a-c) o tratamento com HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> resultou em uma redução da população de células com morfologia alongada (6,2%, IP >3) em comparação ao controle (18,4%, IP >3) e fármacos livres (15,6%, IP >3). Por ser menos agressiva, com morfologia e expressão de junção célula-célula próximos ao de células epiteliais saudáveis, essa linhagem acaba tendo grande parte da sua população com morfologia mais arredondada indicando baixa probabilidade de migração (GIOANNI *et al.*, 1988; MATTE *et al.*, 2019).

Os histogramas obtidos para a SCC9 (Figura 3.5d-f) mostram a tendência de redução na população celular com forma muito alongada (IP >4), quando tratadas com HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> (10,8%, IP >4) em comparação ao controle (21,5%, IP >4) e fármacos livres (17,6%, IP >4). A linhagem SCC9 é mais agressiva, com morfologia e expressão de junção célula-célula próximos ao de fibroblastos, exibindo maior predisposição migratória (GIOANNI *et al.*, 1988; MATTE *et al.*, 2019). Neste caso, a redução no IP após o tratamento das células com a formulação HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> pode ser indicativo de alteração no comportamento migratório dessa linhagem.

Figura 3. 5. Histogramas de distribuição de valores de IP obtidos para a linhagem CAL27 (a) não tratada, (b) tratada com 0,35  $\mu\text{M}$  de CUR e 3,45  $\mu\text{M}$  de MEL livres, e (c) com a HA-



NECUR/MEL, e para a linhagem SCC9 (d) não tratada, (e) tratada com  $0,35 \mu\text{M}$  de CUR and  $3,45 \mu\text{M}$  de MEL livre (f) com a HA-NECUR/MEL, após 24 h. (80–100 células analisadas em cada histograma).



#### 4 CONCLUSÕES

As formulações desenvolvidas nesse trabalho exibiram atividade citotóxica superior aos fármacos livres em modelos de cultura de células 2D, no entanto a associação da CUR e MEL não pareceu afetar a viabilidade celular quando comparado à CUR livre. As nanoemulsões revestidas com HA não demonstraram seletividade ou melhora no perfil citotóxico quando comparadas as não revestidas, mesmo apresentando uma tendência maior de internalização.

Neste caso, a interação entre o CTAB e as membranas celulares pode ter contribuído para o aumento da atividade citotóxica, assim como a interação entre HA e receptores CD44.

A análise visual dos esferoides multicelulares permitiu verificar alterações nas propriedades de adesão célula-célula. Na linhagem saudável HACAT, a presença de HA no revestimento das nanoemulsões pareceu diminuir o efeito sobre a redução na coesão entre as células, podendo ser uma indicação de menor toxicidade. Quanto as células tumorais CAL27 e SCC9, as formulações revestidas e carregadas com CUR e MEL resultaram em esferoides com áreas maiores quando comparadas aos grupos não tratado e tratado apenas com os fármacos livres, indicando capacidade de penetração diferenciado das nanoemulsões na esfera, principalmente no caso da linhagem SCC9 e com menor coesão inicial do esferoide. Ainda foi possível verificar através do IP uma tendência de redução na população de células mais alongadas, podendo significar alteração no perfil migratório na linhagem SCC9 após tratamento com a HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>.





Considerando a incidência de câncer de boca no mundo e no Brasil, a busca por estratégias que possam complementar os esquemas terapêuticos já existentes é primordial para que os pacientes afetados possam ter um melhor prognóstico e qualidade de vida (MORO *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2017). A utilização de plataformas baseadas em nanotecnologia parece ser um caminho promissor na melhora das propriedades de compostos com conhecida atividade antitumoral, assim como no direcionamento mais específicos às células tumorais e possibilidade de utilização de vias de administração menos convencionais, tais como a via bucal (BATRA; PAWAR; BAHL, 2018; ZHANG *et al.*, 2008). Tendo em vista essas questões, esse trabalho propôs a inclusão de 2 compostos com conhecida atividade antitumoral em uma nanoemulsões revestida com HA, com o propósito de não só melhorar as propriedades dos fármacos, mas também proporcionar mucoadesão e direcionamento às células tumorais, permitindo sua aplicação através da via bucal.

Na primeira etapa desse trabalho, foram testados diferentes lipídios catiônicos (CTAB e OA) com o intuito de estabelecer uma carga superficial positiva nas nanoemulsões. Além da carga, esse componente também afeta parâmetros importantes como tamanho de partícula e estabilidade, uma vez que funciona como surfactante impactando na tensão interfacial do sistema formado (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2015a). Os lipídios catiônicos empregados como surfactantes são formados basicamente por uma âncora hidrofóbica, uma cabeça polar e um *linker*, que corresponde à ligação entre a cabeça polar e cauda apolar. Diferenças entre a relação polar/apolar das moléculas proporcionam comportamentos interfaciais singulares, podendo afetar o tamanho de partícula formada (VARGHESE; TOM; KRISHNA CHANDAR, 2017). Sua concentração também parece se relacionar ao tamanho de partícula, uma vez que existe uma tendência à diminuição do tamanho com o aumento da concentração de surfactante (FORMARIZ *et al.*, 2006). Dessa forma, foram avaliadas concentrações de CTAB e OA que variaram de 0,06 até 2 mM combinados com uma concentração fixa de lecitina de soja. A utilização dos demais componentes e suas quantidades foram baseadas em trabalhos que utilizaram emulsificação espontânea como método de preparo e obtenção de sistemas com características aplicáveis ao presente trabalho (AMORIM, 2014; OYARZUN-AMPUERO *et al.*, 2013). A seleção do lipídio catiônico foi realizada com base nos parâmetros de tamanho médio de gotícula, IPD e potencial zeta.

O tamanho de partícula para as nanoemulsões compostas por CTAB variou de 150 até 300 nm, enquanto tamanhos médios maiores foram obtidos para aquelas preparadas com OA, com tamanho entre 222 e 340 nm. De forma geral, para ambos os casos, o aumento da

concentração do lipídio levou ao decréscimo do tamanho com incremento do potencial zeta, que variou de +22 até +58 mV. Menores valores de IPD foram obtidos para as formulações contendo CTAB, considerando que o IPD avalia a homogeneidade de dispersão, valores inferiores a 0,3 sugerem uma dispersão homogênea (DANAEI *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2011). Dessa forma, considerando todos os parâmetros avaliados o lipídio catiônico selecionado para dar continuidade no estudo foi o CTAB, uma vez que o mesmo resultou em menores tamanhos de partículas e populações mais monodispersas, em relação às formulações preparadas com as mesmas concentrações de OA. Como essa formulação passaria ainda por uma etapa de revestimento é esperado que ocorra um incremento de seu tamanho em virtude da deposição do HA na superfície das gotículas, dessa forma, obter tamanhos iniciais de gotículas menores na formulação foi importante para garantir a aplicabilidade da formulação final à via desejada. Além disso, foram obtidas formulações com valores de potencial zeta satisfatórios para promover a estabilidade do sistema inicial e também suficientemente positivos para permitir a ocorrência de interações eletrostáticas que vão proporcionar o revestimento com HA. Quanto a concentração selecionada, foi preciso considerar a toxicidade já descrita para os surfactantes catiônicos. Uma vez que, a cadeia alifática longa desses componentes possivelmente afeta os ácidos graxos da membrana celular, promovendo perturbações na membrana rica em fosfolípidios, resultando em ativação de fosfolipases (ZHANG *et al.*, 2015). Nesse caso, a concentração selecionada foi de 0,5 mM, que foi a menor concentração capaz de formar sistemas com características de tamanho, IPD e potencial zeta satisfatórios a próxima etapa.

O próximo passo, foi a inclusão dos fármacos nessas formulações e avaliação dos parâmetros de teor e EE. Para isso, um método analítico foi desenvolvido por CLAE-DAD, obtendo resposta satisfatória quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, assim como para precisão, exatidão e robustez. Através desse método foi possível avaliar o teor e EE da CUR e MEL utilizando triglicerídeos de cadeia média (TCM, Neobee® 1053, Stepan Company) composto por 44% de ácido cáprico (C10) e 55% caprílico (C8) e óleo de rícino (OR), um triglicerídeo de cadeia longa (TCL) cujo principal componente é o ácido ricinoleico (monoinsaturado, C18) (MENSAH; AWUDZA; O'BRIEN, 2018; ZORZI *et al.*, 2017). Esses óleos são comumente utilizados em sistemas nanoemulsionados (BRUXEL *et al.*, 2012; HALNOR *et al.*, 2018), bem como em sistemas contendo CUR e MEL (KIM *et al.*, 2016; TAKENAKA *et al.*, 2013). É sabido que o tamanho da sua cadeia hidrocarbonada, bem como o grau de saturação de suas ligações afeta a capacidade de solubilização de alguns fármacos (BRUXEL *et al.*, 2012). Maiores detalhes desse estudo foram adicionados no

Apêndice A dessa tese. Em resumo, a utilização de TCM levou a uma baixa recuperação (~ 60%) e associação (~ 70%) de CUR, sendo possível observar a presença de precipitados, devido à baixa solubilidade da CUR em água ( $\text{Log } P \sim 3,2$ ) (ANAND *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2012a). Para as formulações contendo MEL em TCM foram obtidos valores de recuperação superiores a 90%. Entretanto, a EE não ultrapassou cerca de 15 %, mesmo com incremento da concentração de MEL, fato que pode ser atribuído ao seu  $\text{Log } P$  1,6 (FILALI *et al.*, 2017). Quando os fármacos foram inclusos em sistemas compostos por OR houve o aumento na recuperação de CUR das formulações (~ 85%), bem como na EE para CUR (~ 85%) e MEL (~ 20%) sendo o OR eleito como fase oleosa do sistema contendo cerca de 80  $\mu\text{g/mL}$  de CUR e 490  $\mu\text{g/mL}$  de MEL. Além dos óleos, foi testada uma concentração superior (1 mM) e inferior (0,25 mM) de CTAB, afim de analisar se o mesmo poderia contribuir com o aumento de teor e EE, entretanto, não foi observada nenhuma alteração significativa quanto a esses parâmetros (dados não mostrados). Nesse caso, diferenças na solubilidade dos fármacos testados expressos por seus  $\text{Log } P$ , podem explicar os diferentes valores de EE. A CUR é um fármaco mais lipofílico, portanto, encontra-se preferencialmente associado às gotículas da nanoemulsão, enquanto a MEL, por apresentar certa solubilidade em água encontra-se preferencialmente nessa fase.

O revestimento das NE com HA ocorreu através de interação eletrostática pela mistura das NE com carga positiva obtidas anteriormente com uma solução de HA (TINOCO *et al.*, 2018). Foram testadas diferentes concentrações (0,2 a 0,5 mg/mL) de HA com peso molecular distintos (15–30 kDa e 70–90 kDa). Para ambos pesos moleculares de HA a menor concentração testada (0,2 mg/mL) resultou em precipitação do sistema, esse provavelmente se relacionou a total neutralização das cargas do sistema, promovendo uma agregação das partículas formando os precipitados. Desta forma, a etapa crítica no revestimento por atração eletrostática foi a inversão do potencial zeta do sistema. De forma geral, a partir de 0,3 mg/mL de HA ocorreu o incremento do tamanho da partícula e inversão do potencial zeta para valores negativos, sendo um indicativo da presença de HA no revestimento das NE. O potencial zeta obtido em todos os casos foi bastante próximo de -30 mV, importante para garantir a repulsão eletrostática entre as gotículas e manutenção da estabilidade do sistema a longo prazo. Ocorreu um incremento no tamanho e o IPD das partículas revestidas em função do aumento do peso molecular e concentração de HA. Isso pode ocorrer devido à forte ligação do HA com moléculas de água, o que lhe garante alta capacidade de retenção, resultando em um revestimento que ocupa um grande domínio hidrodinâmico (HUANG; CHEN, 2019; PAN *et al.*, 2013). Além

disso, cadeias mais extensas (70–90 kDa) podem produzir um impedimento estérico maior quando associadas à superfície das NE, afetando a distribuição do mesmo no revestimento, o que poderia explicar o maior IPD desse grupo de formulações. Dessa forma, o HA de menor peso molecular foi selecionado (15–30 kDa) na concentração de 0,3 mg/mL resultado tamanhos de partícula de  $226,7 \pm 5,4$  nm, potencial zeta de  $-28,3 \pm 2,5$  mV e IPD  $0,236 \pm 0,01$ . A inclusão dos fármacos nesse sistema não provocou alterações significativas nesses parâmetros, mas no caso da MEL pareceu aumentar a quantidade de fármaco associada das NE, que passou de  $22,1 \pm 1,3\%$  para  $32,0 \pm 1,4\%$ . Esse aumento pode estar relacionado a uma maior adsorção de MEL na interface óleo/água devido ao aumento da polaridade nessa região pela presença de HA. Além disso, quando em solução as cadeias de HA assumem uma estrutura enovelada aleatória semiflexível, o que pode favorecer a inclusão das moléculas de MEL no volume livre das cadeias de HA (HUANG; CHEN, 2019; PAN *et al.*, 2013).

Para avaliar a estabilidade das NE obtidas, um ensaio em condições aceleradas foi realizado, através dele informações quanto a separação de fases do sistema (cremagem) foram determinadas. Nesse caso, as formulações revestidas HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> apresentaram índices de instabilidade maiores ( $\sim 0,250$ ) quando comparadas a NE<sub>CUR/MEL</sub> ( $\sim 0,170$ ), sendo esse processo mais evidente em temperaturas maiores 25 °C. Ainda assim, todas as formulações foram consideradas estáveis, pois apresentaram índice de instabilidade inferior a 0,3.

Quanto ao perfil de liberação dos fármacos avaliada pelo método de membrana de diálise, foi possível observar que para os fármacos livres houve uma rápida difusão para o meio receptor, tendo ao final de 30 min praticamente 100% de liberação. Já quando associados em NE<sub>CUR/MEL</sub> e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> os perfis de liberação foram mais lentos, indicando a capacidade das NE controlarem a liberação. Foi obtido um perfil de liberação mais controlado no caso da CUR, após 3 h a quantidade liberada foi de cerca de 50% para NE<sub>CUR/MEL</sub> e 70% para HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>, indicando que a presença de HA no sistema teve um efeito de barreira reduzindo a difusão do fármaco presente no núcleo oleoso para o meio externo aquoso. Já para a MEL, se observou um efeito *burst* devido a grande parte desse fármaco não estar associado às NE, encontrando-se livre para liberação na parte externa do sistema. Nesse caso, na primeira hora de ensaio houve uma liberação de 70% a 80% independentemente do revestimento de HA.

Buscando avaliar a aplicabilidade das formulações desenvolvidas quando a via de administração bucal, foram avaliadas as propriedades mucoadesivas. Em relação a interação com a mucina, se observou um aumento no tamanho das partículas em virtude da porção de mucina adsorvida na superfície, ou combinação desse fenômeno com a capacidade de formação



e agregados, que no caso da NE<sub>CUR/MEL</sub> veio acompanhada da inversão do potencial zeta. A adsorção de mucina na HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> ocorreu apesar das forças repulsivas presentes em virtude de cargas igualmente negativas. Complementando esses resultados, NE<sub>CUR/MEL</sub> e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> exibiram propriedades mucoadesivas no ensaio em texturômetro, sendo significativamente maior o trabalho de adesão ( $W_{adh}$ ) e força máxima para destacamento ( $F_{max}$ ) obtido por HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>. Nesse caso, a presença de HA com abundante número de grupos carboxílicos, resulta em muitas ligações de hidrogênio, sendo essa a força considerada como uma das mais importantes para o processo de mucoadesão, combinada a sua capacidade de emaranhamento na camada mucosa (CARVALHO *et al.*, 2010).

A atividade citotóxica das formulações e fármacos livres foi avaliada pelos métodos de MTT, nas linhagens HACAT e CAL27, bem como pelo método de SRB nas mesmas linhagens citadas incluindo a SCC9. Cabe aqui ressaltar que os ensaios foram realizados por grupos de pesquisa distintos, utilizando densidades celulares diferentes no plaqueamento. A técnica de MTT é capaz de medir a viabilidade celular com base no dano mitocondrial, isso ocorre através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais, quantificadas pela redução do MTT (sal de coloração amarela, solúvel em água) à formazan (cristal de coloração púrpura, insolúvel em água) (MOSMANN, 1983). Já a técnica de SRB utiliza um corante de cor rosa intenso (aminoxantina) de caráter aniônico que é capaz de se ligar eletrostaticamente às porções terminais dos aminoácidos das células previamente fixadas com ácido tricloroacético. A ligação do SRB é estequiométrica e a quantidade de corante extraído das células é diretamente proporcional a massa total de proteína, dessa forma, correlacionada com o número de células (SKEHAN *et al.*, 1990). Essa técnica, diferentemente da MTT, não depende da atividade metabólica celular, quanto maior o número de células viáveis, maior a captação do corante e conseqüentemente maior absorvância. A superioridade da técnica de SRB em relação a de MTT foi descrita por Keepers *et al* (1991) sendo atualmente o ensaio usado pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos na avaliação de drogas com atividade antitumoral (PAPADIMITRIOU; HATZIDAKI; PAPASOTIRIOU, 2019).

Avaliando os resultados de citotoxicidade na linhagem saudável em ambas metodologias se observou redução na viabilidade celular dose-dependente que pode ser atribuída a presença de CUR e CTAB nas formulações, assim como já verificado em estudos anteriores que demonstraram a sensibilidade da HACAT a esses componentes (CAMPOS *et al.*, 2017; LUNDTVIG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). No ensaio de MTT, a combinação de CUR/MEL livre ou associada às NE pareceu reduzir a citotoxicidade causada na HACAT

quando comparada a CUR livre ou associada às nanoemulsões, assim como o revestimento de HA. Demonstrando a capacidade da MEL na proteção contra danos relacionados a EROS e manutenção da viabilidade celular (DZIĘGIEL *et al.*, 2002; HIPLER; FISCHER; ELSNER, 2003; IZYKOWSKA *et al.*, 2009) e do revestimento de HA na redução da citotoxicidade (ZHANG *et al.*, 2015). Já através da técnica SRB, não foi possível verificar qualquer efeito de redução da citotoxicidade causado pela inclusão de MEL ou HA nos sistemas desenvolvidos, não havendo diferença estatística entre os grupos NE<sub>CUR</sub>, HA-NE<sub>CUR</sub>, NE<sub>CUR/MEL</sub> e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>. Ainda na HACAT, a avaliação capacidade de produzir apoptose foi investigada por citometria de fluxo. Quando expostas a maior concentração testada, cerca de 75% das células sofreram apoptose após 24 h de tratamento. No entanto, não foi observada nenhuma diferença estatística entre os grupos com fármacos livres ou associados nas NE.

Considerando as linhagens tumorais, foi observado que as NE não carregadas (NE<sub>B</sub> e HA-NE<sub>B</sub>) não demonstraram efeito citotóxico (viabilidade > 80) e que as formulações NE<sub>CUR</sub>, HA-NE<sub>CUR</sub>, NE<sub>CUR/MEL</sub> e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> apresentaram efeito citotóxico superior aos fármacos livres na maioria das concentrações testadas. Fato que pode ser justificado pelo resultado do ensaio de internalização celular, que avaliou a quantidade de CUR internalizada na CAL27 a partir das formulações (NE<sub>CUR</sub> e HA-NE<sub>CUR</sub>) e fármaco livre, obtendo resultados significativamente superiores para as NE.

Para CAL27, que foi estudada utilizando-se das técnicas de SRB e MTT, houve o aumento da citotoxicidade quando tratada com NE<sub>CUR</sub>, HA-NE<sub>CUR</sub>, NE<sub>CUR/MEL</sub> e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> em comparação aos fármacos livres para ambas as técnicas. Entretanto, novamente através do ensaio por MTT, tanto a associação dos fármacos quanto o revestimento com HA foram capazes de produzir citotoxicidade diferente entre os grupos NE<sub>CUR</sub> (~ 45% de viabilidade), HA-NE<sub>CUR</sub> (~ 60% de viabilidade), NE<sub>CUR/MEL</sub> (~ 40% de viabilidade) e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> (~ 45% de viabilidade) na maior dose testada. Considerando os resultados da viabilidade celular obtidos por SRB, nenhuma diferença estatística foi determinada entre os grupos NE<sub>CUR</sub>, HA-NE<sub>CUR</sub>, NE<sub>CUR/MEL</sub> e HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> que apresentaram viabilidade celular em torno de 20% com a maior dose testada. Indo de encontro como no que foi observado por citometria de fluxo, indicando que pelo menos 80% das células CAL27 se encontram em estágio apoptótico. Para SCC9, analisada somente pelo método de SRB, o mesmo comportamento descrito anteriormente é observado. Nenhuma diferença estatística é encontrada com o tratamento das diferentes NE. Apesar da combinação entre fármacos não desencadear incremento da atividade citotóxica tanto na linhagem CAL27 quanto SCC9 (na análise por

SRB), observou-se que a linhagem mais agressiva (SCC9) foi mais sensível à MEL (~ 65% de redução da viabilidade), quando comparada à linhagem CAL27 menos agressiva (~ 45% de redução de viabilidade). O que pode justificar o emprego da associação de CUR/MEL como forma de aumentar o espectro de atividade citotóxica.

Encerrado o estudo de viabilidade celular, esferoides de células saudáveis foram tratados com as formulações não carregadas NE<sub>B</sub> e HA-NE<sub>B</sub>. Considerando a maior dose testada no ensaio de citotoxicidade (35 µM de CUR e 345 µM) quantidades equivalentes de NE<sub>B</sub> e HA-NE<sub>B</sub> foram adicionadas às placas com os esferoides HACAT resultando no aumento da área do esferoide em aproximadamente 24% quando tratado com NE<sub>B</sub> após 72 h, indicando capacidade de penetração da formulação promovendo uma dispersão celular que pode ser atribuída à redução da coesão celular, sugerindo toxicidade da NE<sub>B</sub> frente às células saudáveis, justificando nossa escolha quanto a prosseguir o ensaio somente com a formulação revestida com HA. Adicionando HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> e CUR/MEL em concentrações crescentes que partiram de 0,03 µM de CUR e 0,3 µM de MEL até 3,5 µM de CUR e 34,5 µM de MEL nos esferoides SCC9 e CAL27 se observou alteração na integridade dos esferoides após 72 h de tratamento com a maior dose testada. Esses resultados, expressos como aumento da área dos esferoides, acabam por evidenciar a capacidade de penetração aumentada das formulações nas esferas em relação a CUR/MEL. No caso da SCC9, a penetração pode ter sido favorecida pela redução da adesão celular devido a menor expressão de E-caderina já observada para essa linhagem (JI *et al.*, 2005; MATTE *et al.*, 2019). Levando à desagregação da esfera, refletindo no aumento em cerca de 70% na área do esferoide em relação ao tempo 0 (zero). Por outro lado, a integridade dos esferoides de HACAT não foram afetados em nenhuma concentração testada, indicando que baixas concentrações de CUR e MEL associadas à HA-NE são capazes de modificar a adesão célula-célula dos tumores esferoides, sem afetar a adesão das células epiteliais não tumorais.

Considerando a migração celular como propriedade decisiva no desenvolvimento de metástase, o índice de polaridade (IP) das células SCC9 e CAL27 foi determinado. A linhagem CAL27 apresenta morfologia e expressão de fatores que definem uma morfologia mais arredondada indicando reduzida probabilidade de migração, apresentando boa parte da população de células com menor IP no histograma construído (GIOANNI *et al.*, 1988; MATTE *et al.*, 2019). Para a linhagem SCC9, com conhecida predisposição migratória, o tratamento com HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> pareceu reduzir cerca de 10% a população de células que exibiam morfologia muito alongada (IP >4), exibindo efeito superior a CUR/MEL que reduziu apenas

cerca de 4%. Tais resultados podem indicar que além de atividade citotóxica a formulação HA-NE<sub>CUR/MEL</sub> pode afetar as propriedades migratórias dessa célula.

**6 CONCLUSÃO GERAL**

---



A partir da otimização das formulações quanto ao lipídio catiônico (CTAB) e sua concentração (0,5 mM) a técnica de emulsificação espontânea foi capaz de produzir nanoemulsões com carga superficial positiva ( $> 30$  mV), tamanho nanométrico ( $\sim 200$  nm) e baixo índice de polidispersão ( $< 0,3$ ). A utilização de óleo de rícino como parte da fase orgânica garantiu uma maior associação dos fármacos nos sistemas desenvolvidos, os quais foram quantificados com sucesso a partir da metodologia validada.

O método proposto para revestimento das nanoemulsões com HA foi dependente da concentração e peso molecular do HA utilizado, a inversão da carga inicialmente positiva para negativa, assim como incremento no tamanho médio das partículas e análise de morfologia foram utilizados como parâmetros para determinar o sucesso da interação eletrostática sugerida. As nanoemulsões revestidas mantiveram tamanho nanométrico ( $\sim 220$  nm), carga superficial suficiente para manter estabilidade ( $\sim -30$  mV) e baixo índice de polidispersão ( $< 0,3$ ). As nanoemulsões se mostraram estáveis frente ao ensaio em condições aceleradas, mesmo com a adição do revestimento, não foi observada a separação das fases. A inclusão de HA alterou o índice de instabilidade obtido, porém se manteve dentro de uma faixa aceitável ( $< 0,3$ ).

A inclusão dos fármacos nas nanoemulsões foi capaz de controlar sua liberação, para a MEL que estava em maior quantidade na fase externa do sistema ocorreu uma rápida liberação inicial. Para a CUR a liberação ocorreu de forma mais lenta, afetada pela difusão do fármaco do núcleo oleoso para o meio externo, tendo ainda o revestimento de HA efeito de barreira, retardando esse processo.

As nanoemulsões exibiram capacidade de interação com a mucina, expressa por alteração no tamanho médio dos sistemas, potencial zeta (no caso das não revestidas) e quantidade de mucina adsorvida. No caso da formulação com HA, essa interação ocorreu apesar das forças repulsivas presentes. A força e trabalho de adesão determinado em texturômetro demonstrou que o revestimento proporcionou formulações com maior capacidade mucoadesiva, provavelmente devido a abundância de grupamentos hidroxílicos e carboxílicos que o HA apresenta, o que possibilitou a realização de muitas ligações de hidrogênio com a mucina. Além disso, quando em solução o HA apresenta uma conformação aleatoriamente enovelada, podendo contribuir com a mucoadesão por meio do seu emaranhamento com a mucina.

A citotoxicidade das nanoemulsões foi determinada por dois métodos (MTT e SRB) que resultaram em resultados conflitantes quanto ao revestimento das formulações e associação dos fármacos. Pela técnica de MTT (HACAT e CAL27), se observa no caso da HACAT que a

presença de MEL e HA na formulação parece ter exercido proteção contra os danos exercidos por CUR e CTAB nas células, enquanto na linhagem CAL27 a associação de CUR/MEL parece ter potencializado a atividade citotóxica. Pela técnica de SRB (HACAT, CAL27 e SCC9), apesar das nanoemulsões terem mostrado atividade citotóxica superior, mesmo nas menores concentrações testadas, não houve diferença estatística entre as formulações, indicando que nem o revestimento ou a associação de CUR/MEL foi capaz de alterar a atividade citotóxica. O que pode ser complementado com o resultado obtido para a internalização de CUR realizada com a CAL27, onde se observou uma maior quantidade internalizada para a CUR quando inclusa nas nanoemulsões em comparação ao fármaco livre, mas entre as formulações não conseguiu se estabelecer diferença estatística nas condições testadas.

O efeito das formulações em modelo de esferoide multicelular trouxe informações acerca da capacidade de penetração nas esferas, possíveis alterações na adesão célula-célula, sugerindo ou não citotoxicidade. O esferoide de HACAT tratado com as nanoemulsões não carregadas pareceu sofrer maior perda da sua integridade coesiva quando na presença da nanoemulsão não revestida (NE<sub>B</sub>), onde na maior concentração testada houve um crescimento consideravelmente superior da sua área em comparação a formulação revestida (HA-NE<sub>B</sub>), sugerindo citotoxicidade. Considerando a formulação carregada com os fármacos e revestida (HA-NE<sub>CUR/MEL</sub>) nas linhagens tumorais, ela foi capaz de gerar alterações na área dos esferoides superiores ao que foi visto para os fármacos livres. Isso indica que as nanoemulsões apresentam maior capacidade de penetrar na esfera celular, resultando em alteração significativa da integridade do esferoide, principalmente no caso da SCC9 que apresenta uma menor adesão celular. Esses dados dão suporte ao que foi verificado no modelo 2D, sugerindo a superioridade dos sistemas desenvolvidos em comparação aos fármacos livres.

O índice de polaridade das células após o tratamento foi utilizado como indicativo da alteração do perfil migratório das células, passo importante quando se pensa em invasão e metástase. Por meio desse ensaio, houve redução da população de células com perfil mais alongado (polarizado) quando houve o tratamento com as nanoemulsões em comparação aos fármacos livres, fato mais evidente para a linhagem SCC9 que é uma célula com maior probabilidade de migração em comparação a CAL27. São necessários mais estudos que possam dar suporte ao que foi determinado inicialmente aqui, tais como, velocidade e direcionalidade da migração celular, para então determinar que as nanoemulsões desenvolvidas nesse trabalho apresentam além da atividade citotóxica e condição de penetrar no esferoide, capacidade de interferir no perfil migratório das linhagens tumorais de câncer de boca testadas nesse trabalho.



Com os resultados obtidos nessa tese constatou-se que a aplicação desses sistemas pode ser particularmente interessante na terapia adjuvante no câncer de boca, seja nas fases iniciais da carcinogênese (lesões pré-malignas) onde uma abordagem não invasiva pode ser preferida pelo paciente, assim como nos casos onde não há possibilidade de remoção cirúrgica total da lesão tumoral e recidivas. Além disso, abre possibilidade para outras aplicações envolvendo afecções na cavidade oral, servindo de suporte aos profissionais de odontologia na melhora da qualidade de vida de seus pacientes.



**REFERÊNCIAS**

---



- ADCOCK, A. F. *et al.* Three-Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for in-vitro Evaluation of Anticancer Drugs. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, [S.l.], v. 6, n. 03, p. 1-12, 2015.
- ARDITO, F. *et al.* Effects of Curcumin on Squamous Cell Carcinoma of Tongue: An In Vitro Study. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 233–243, 2018.
- BRUXEL, F. *et al.* Nanoemulsions As Parenteral Drug Delivery Systems. **Química Nova**, [S.l.], v. 35, n. 9, p. 1827–1840, Jul. 2012.
- CAMPOS, P. S. *et al.* Low Doses of Curcuma longa Modulates Cell Migration and Cell–Cell Adhesion. **Phytotherapy Research**, [S.l.], v. 31, n. 9, p. 1433–1440, Jul. 2017.
- CHEN, C.-F. *et al.* Synergistic inhibitory effects of cetuximab and curcumin on human cisplatin-resistant oral cancer CAR cells through intrinsic apoptotic process. **Oncology Letters**, [S.l.], v. 16, n. 5, p. 6323–6330, Nov. 2018.
- CLAUSEN, D. N. *et al.* Desenvolvimento de Método por CLAE para Quantificação de Orfenadrina, Paracetamol e Cafeína em Formulações Farmacêuticas. **Revista Virtual de Química**, [S.l.], v. 7, n. 6, p. 2066–2079, 2015. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v7n6a12.pdf>. Acesso 20 agosto de 2021.
- COSTA, M. C. DA *et al.* Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o in vitro do in vivo. **Vigilância Sanitária em Debate**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 72, 2018. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/1047>. Acesso em 17 outubro de 2021.
- CUTANDO, A. *et al.* Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. **Odontology**, [S.l.], v. 102, p. 290–296, 2014.
- D’SOUZA, S.; ADDEPALLI, V. Preventive measures in oral cancer: An overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 107, p. 72–80, Nov. 2018.
- DWIASTUTI, R. *et al.* Analytical method validation and determination of free drug content of 4-n-butylresorcinol in complex lipid nanoparticles using RP-HPLC method. **Indonesian Journal of Chemistry**, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 496–502, 2018.
- EDMONDSON, R. *et al.* Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and Drug Development Technologies**, [S.l.], v. 12, n. 4, p. 207–218, May. 2014.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S. Polarity proteins in migration and invasion. **Oncogene**, [S.l.], v. 27, n. 55, p. 6970–6980, 2008.
- FAN, T. *et al.* Inhibiting MT2-TFE3-dependent autophagy enhances melatonin-induced apoptosis in tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Pineal Research**, [S.l.], v. 64, n. 2, p. 1–18, Oct. 2018.
- FERNANDEZ-GIL, B. I. *et al.* Melatonin Enhances Cisplatin and Radiation Cytotoxicity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Stimulating. **Oxidative Medicine and Cellular**

**Longevity**, [S.l.], v. 2019, Feb. 2019. Disponível em:  
<https://downloads.hindawi.com/journals/omcl/2019/7187128.pdf>. Acesso em: 12 Jul. 2021.

FRIEDRICH, J. *et al.* Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. 309–324, Feb. 2009.

GIOANNI, J. *et al.* Squamous Cytotoxic Tumor Cell Lines Derived from to Cell Carcinomas Treatment of the Tongue : and Response Establishment , Characterization. **European Journal of Cancer**, [S.l.], v. 24, n. 9, p. 1445–1455, 1988.

GONÇALVES, N. N. *et al.* Molecular markers of angiogenesis and metastasis in lines of oral carcinoma after treatment with melatonin. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 14, n. 9, p. 1302–1311, 2014.

HESS, B. S. Desenvolvimento e validação de método por CLAE-DAD para determinação simultânea de captopril, hidroclorotiazida e seus compostos relacionados e avaliação da equivalência farmacêutica de medicamentos anti-hipertensivos. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 199, 2011.

IZYKOWSKA, I. *et al.* Effect of Melatonin on Human Keratinocytes and Fibroblasts Subjected to UVA and UVB Radiation In Vitro. **In vivo**, [S.l.], v. 23, p. 739–745, 2009.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 123–127, Apr. 2015.

JESCHEK, D. *et al.* A versatile, quantitative analytical method for pharmaceutical relevant lipids in drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S.l.], v. 119, p. 37–44, 2016.

Jl, C. *et al.* Identification and quantification of differentially expressed proteins in E-cadherin deficient SCC9 cells and SCC9 transfectants expressing E-cadherin by dimethyl isotope labeling, LC-MALDI MS and MS/MS. **Journal of Proteome Research**, [S.l.], v. 4, n. 5, p. 1419-1426, May. 2005.

KHAFIF, A. *et al.* Curcumin: A potential radio-enhancer in head and neck cancer. **Laryngoscope**, [S.l.], v. 119, n. 10, p. 2019–2026, Oct. 2009

KRISANAPRAKORNKIT, S.; IAMAROON, A. Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Scholarly Research Network Oncology**, [S.l.], v. 2012, p. 1–10, Jan. 2012.

LAMERS, M. L. *et al.* High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. **PLoS ONE**, [S.l.], v. 6, n. 8, p. 1–9, Aug. 2011.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: A physically integrated molecular process. **Cell**, [S.l.], v. 84, n. 3, p. 359–369, Feb. 1996.

LINDNER, G.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Resveratrol-Loaded Polymeric Nanoparticles: Validation of an HPLC-PDA Method to Determine the Drug Entrapment and

Evaluation of Its Antioxidant Activity. **The Scientific World Journal**, [S.l.], v. 2013, p. 1–9, Sep. 2013.

LIU, S.; MADU, C. O.; LU, Y. The Role of Melatonin in Cancer Development. **Oncomedicine**, [S.l.], v. 3, p. 37–47, May. 2018.

LOTEMPIO, M. M. *et al.* Curcumin Suppresses Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Therapy : Preclinical**, [S.l.], v. 11, n. 19, p. 6994–7003, Oct. 2005.

LUDWIG, N. *et al.* CD44(+) tumor cells promote early angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, [S.l.], v. 467, p. 85–95, Dec. 2019.

MASUELLI, L. *et al.* Resveratrol potentiates the in vitro and in vivo anti-tumoral effects of curcumin in head and neck carcinomas. **Oncotarget**, [S.l.], v. 5, n. 21, p. 10745–10762, Nov. 2014.

MATTE, B. F. *et al.* Matrix stiffness mechanically conditions EMT and migratory behavior of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cell Science**, [S.l.], v. 132, n. 1, p.1-10. Dec. 2019.

MATTHEOLABAKIS, G. *et al.* Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: From receptor biology to nanomedicine. **Journal of Drug Targeting**, [S.l.], v. 23, n. 7–8, p. 605–618, 2015

MAUPAS, C. *et al.* Surfactant dependent toxicity of lipid nanocapsules in HaCaT cells. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 411, n. 1–2, p. 136–141, Apr. 2011.

MEHTA, A.; KAUR, G. Potential role of melatonin in prevention and treatment of oral carcinoma. **Indian Journal of Dentistry**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 56–61, Apr. 2014.

MOKHTARI, R. B. *et al.* Combination therapy in combating cancer. **Oncotarget**, [S.l.], v. 8, n. 23, p. 38022–38043, Mar. 2017.

NGUYEN, H. T.-L.; NGUYEN, S. T.; PHAM, P. VAN. Concise Review: 3D cell culture systems for anticancer drug screening. **Biomedical Research and Therapy**, [S.l.], v. 3, n. 5, p. 625–632, May. 2016.

NUNES, A. S. *et al.* 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. **Biotechnology and Bioengineering**, [S.l.], v. 116, n. 1, p. 206–226, 2019.

PALMER, A. C.; SORGER, P. K. Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy. **Cell**, [S.l.], v. 171, n. 7, p. 1678-1691, Dec. 2017.

PRGOMET, Z. *et al.* Migration and invasion of oral squamous carcinoma cells is promoted by WNT5A, a regulator of cancer progression. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, [S.l.], v. 44, n. 10, p. 776–784, Oct. 2015.

RAMOS, G. *et al.* Fibronectin modulates cell adhesion and signaling to promote single cell migration of highly invasive oral squamous cell carcinoma. **PLoS ONE**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 1–18, Mar. 2016.

SÁNCHEZ, A.; CALPENA, A. C.; CLARES, B. Evaluating the oxidative stress in inflammation: Role of melatonin. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 16, n. 8, p. 16981–17004, Jul. 2015.

SANDRI, G. *et al.* Mucoadhesive and penetration enhancement properties of three grades of hyaluronic acid using porcine buccal and vaginal tissue, Caco-2 cell lines, and rat jejunum. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S.l.], v. 56, n. 9, p. 1083–1090, Sep. 2004.

SCHIBORR, C. *et al.* A validated method for the quantification of curcumin in plasma and brain tissue by fast narrow-bore high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.l.], v. 397, n. 5, p. 1917–1925, 2010.

SILVA, L. *et al.* Lesões Orais Malignas e Potencialmente Malignas: percepção de cirurgiões-dentistas e graduandos de odontologia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S.l.], v. 64, n. 1, p. 35-43, 30 mar. 2018.

SILVEIRA, E. *et al.* Lesões orais com potencial de malignização: análise clínica e morfológica de 205 casos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.l.], v. 45, n. 3, p. 233-238, jun. 2009.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, [S.l.], v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.

TEIXEIRA, H. F. *et al.* Cationic nanoemulsions as nucleic acids delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 534, n. 1–2, p. 356–367, Dec. 2017.

TEKKELI, S. E. K.; KIZILTAS, M. V. Current HPLC Methods for Assay of Nano Drug Delivery Systems. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 17, p. 1588–1594, 2017.

TINOCO, L. M. *et al.* Hyaluronic acid-coated nanoemulsions loaded with a hydrophobic ion pair of all-trans retinoic acid for improving the anticancer activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 54, n. 4, p. 1–10, Jan. 2018.

VIEIRA, E.; LEMOS-SENNA, E. Application of a New Validated HPLC-PDA Method for Simultaneous Determination of Curcumin and Melatonin in Hyaluronic Acid-Coated Nanoemulsions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 31, n. 3, p. 467–475, 2020.

WANG, Y. *et al.* Melatonin Inhibits the Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma via Inducing miR-25-5p Expression by Directly Targeting NEDD9. **Frontiers in Oncology**, [S.l.], v. 10, p. 1–14, Dec. 2020.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. **Neoplasia**, v. 17, n. 1, p. 1–15, Jan. 2015.

WICKENS, J. M. *et al.* Recent advances in hyaluronic acid-decorated nanocarriers for targeted cancer therapy. **Drug Discovery Today**, [S.l.], v. 22, n. 4, p. 665–680, Apr. 2017.

XIN, X. *et al.* 3D cell coculture tumor model: A promising approach for future cancer drug discovery. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 78, p. 148–160, 2019.



YANG, C.-Y. *et al.* Melatonin exerts anti-oral cancer effect via suppressing LSD1 in patient-derived tumor xenograft models. **Oncotarget**, [S.l.], v. 8, n. 20, p. 33756–33769, May 2017.

YANG, X. *et al.* Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. **Cancer Letters**, [S.l.], v. 334, n. 2, p. 338–345, Jul. 2013.

YAO, Y. *et al.* Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [S.l.], v. 7, n, p. 1–14, Aug. 2020.

ZANONI, M. *et al.* 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 6, n. 7, p. 1–11, Aug. 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Cytotoxicity of Organic Surface Coating Agents Used for Nanoparticles Synthesis and Stability. **Toxicol In Vitro**, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 1–17, 2015.

ZHEN, L. *et al.* Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion via EGFR signaling pathways. **International Journal of Clinical & Experimental Pathology**, [S.l.], v. 7, n. 10, p. 6438–6446, Sep. 2014.

ZHONG, L. *et al.* Exploring the relationship of hyaluronic acid molecular weight and active targeting efficiency for designing hyaluronic acid-modified nanoparticles. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 27, p. 521-530, Sep. 2018.



## **APÊNDICE A – SELEÇÃO DO ÓLEO VEGETAL E CONCENTRAÇÃO DOS FÁRMACOS CURCUMINA E MELATONINA PARA AS NANOEMULSÕES**

---

### **APRESENTAÇÃO**

Este apêndice é constituído por texto e tabelas que descrevem a etapa do trabalho em que foram testados os óleos vegetais: TCM e OR, bem como diferentes concentrações dos fármacos CUR e MEL.

### **INTRODUÇÃO**

A fase oleosa de NE é geralmente selecionada levando em conta a solubilidade e estabilidade dos fármacos a serem veiculados, bem como a estabilidade da formulação. Muitas vezes um estudo de solubilidade dos fármacos em diferentes óleos constitui uma das etapas iniciais no desenvolvimento de uma formulação. Dessa forma, foram preparadas NE contendo os fármacos em questão para a seleção da fase oleosa, mantendo-se a concentração de CTAB de 0,5 mM, conforme descrito no Capítulo II.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **MATERIAIS**

- Triglicerídeos de cadeia média Neobee 1053<sup>®</sup> (TCM, Stepan Company, Estados Unidos)
- Óleo de rícino (Sigma–Aldrich, Estados Unidos)
- Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB, Sigma–Aldrich, Estados Unidos)
- Lecitina de soja Lipoid S100<sup>®</sup> (Lipoid GmbH, Alemanha)
- Curcumina (CUR, ≥ 94 %, Sigma–Aldrich, Estados Unidos)
- Melatonina (MEL, ≥ 98 %, Sigma–Aldrich, Estados Unidos)
- Acetona P.A (Neon comercial, Brasil)
- Etanol P.A (Neon comercial, Brasil)
- Acetonitrila grau CLAE (Honeywell International Inc., Estados Unidos)

- Metanol grau CLAE (Honeywell International Inc., Estados Unidos)
- Ácido fórmico grau CLAE (Fisher Scientific GmbH, Alemanha)

## MÉTODO

### **Determinação do teor e eficiência de encapsulação dos fármacos**

O teor e a eficiência de encapsulação (EE) para a CUR e MEL nas NE foi determinada por CLAE, seguindo metodologia previamente validada, descrita no Capítulo I. Para as análises, uma alíquota de cada NE foi diluída adequadamente em balão volumétrico com acetonitrila. As soluções resultantes foram filtradas em membrana de PVDF (0,22  $\mu\text{m}$ , Milipore) e injetadas no cromatógrafo. O teor de CUR e MEL foi dado em função da porcentagem de fármaco recuperada.

Para determinar a EE de cada fármaco as NE foram submetidas à ultracentrifugação à 55.000 x g, durante 30 minutos à 25°C. Para essa metodologia, as amostras foram acondicionadas em tubos quick-seal<sup>®</sup> (Polypropilene Bell-top, Beckman Coulter, EUA). Após o tempo estabelecido, os tubos foram seccionados de modo a permitir a retirada de uma alíquota do sobrenadante para análise. A EE da CUR e MEL nas NE foi determinada como sendo a diferença percentual entre a concentração total, obtida após completa dissolução das NE em acetonitrila e a concentração encontrada no sobrenadante.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A avaliação quanto ao tipo de veículo oleoso a fazer parte da NE desenvolvida foi realizada utilizando TCM e OR, combinados com concentrações fixas dos demais componentes da formulação. As concentrações de fármacos também foram analisadas, conforme descrito na Tabela A.1.

Tabela A. 1. Composição final das nanoemulsões contendo curcumina e melatonina para a seleção da fase oleosa da formulação.

Formulação	TCM <sup>a</sup> (mg)	OR <sup>e</sup> (mg)	Lecitina (mg)	CTAB <sup>b</sup> (mM)	MEL <sup>c</sup> (mg)	CUR <sup>d</sup> (mg)	Água (mL)
F1	400	-	60	0,5	-	10	20
F2	400	-	60	0,5	-	2	20
F3	400	-	60	0,5	10	-	20
F4	400	-	60	0,5	20	-	20
F5	-	400	60	0,5	-	10	20
F6	-	400	60	0,5	-	2	20
F7	-	400	60	0,5	10	-	20
F8	-	400	60	0,5	20	-	20

<sup>a</sup> Triglicerídeos de cadeia média; <sup>b</sup> Brometo de cetiltrimetil amônio; <sup>c</sup> Melatonina; <sup>d</sup> Curcumina. <sup>e</sup> Óleo de rícino.

A caracterização das NE obtidas quanto à tamanho médio das gotículas, IPD e potencial zeta encontra-se disposta na Tabela A.2. Para avaliar a influência do óleo sobre a capacidade de associação dos fármacos foram determinados o teor dos fármacos nas formulações, avaliando duas concentrações, que foram expressas como teor, porcentagem de fármaco recuperado e eficiência de encapsulação (EE).

Tabela A. 2. Efeito do tipo de óleo vegetal empregado nas nanoemulsões sobre o tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta, recuperação dos fármacos e eficiência de encapsulação.

Formulação	Tamanho <sup>c</sup> (nm)	Zeta (mV)	Teor (µg/mL)	Recuperação (%)	EE <sup>d</sup> (%)
<b>TCM<sup>a</sup></b>					
F1 <sub>CUR-10</sub>	204,6 ±9,3 (0,201 ±0,02)	40,6 ±1,3	112,5 ±5,5	22,5 ±1,1	58,7 ±4,5
F2 <sub>CUR-2</sub>	198,7 ±10,1 (0,185 ±0,01)	44,2 ±2,2	66,0 ±3,3	66,0 ±3,3	68,0 ±1,2
F3 <sub>MEL-10</sub>	200,7 ±12,3 (0,164 ±0,01)	43,8 ±2,1	494,5 ±28,0	98,9 ±5,6	14,7 ±3,8
F4 <sub>MEL-20</sub>	206,3 ±16,1 (0,172 ±0,02)	47,2 ±0,9	938,0 ±23,0	93,8 ±2,3	15,3 ±2,2
<b>OR<sup>b</sup></b>					
F5 <sub>CUR-10</sub>	187,4 ±8,9 (0,200 ±0,01)	41,5 ±0,3	153,0 ±10,0	30,6 ±2,0	65,7 ±3,6
F6 <sub>CUR-2</sub>	196,5 ±7,6 (0,190 ±0,01)	44,7 ±0,9	86,2 ±3,3	86,2 ±3,3	85,4 ±3,1
F7 <sub>MEL-10</sub>	189,9 ±17,3 (0,174)	39,8 ±2,1	486,1 ±18,0	97,3 ±3,6	20,5 ±1,8
F8 <sub>MEL-20</sub>	199,3 ±9,1 (0,175)	40,5 ±2,1	986,0 ±14,0	98,6 ±1,4	24,0 ±4,5

<sup>a</sup> Triglicerídeos de cadeia média; <sup>b</sup> Óleo de rícino; <sup>c</sup> Entre parênteses: índice de polidispersão (IPD); <sup>d</sup> Eficiência de encapsulação. CUR ou MEL indicam a preparação de nanoemulsões com curcumina e melatonina respectivamente, e o número que segue representa a quantidade adicionada, 10 ou 2 mg para a CUR e 10 e 20 mg para a MEL.

Em relação aos parâmetros de tamanho de gotícula, IPD e potencial zeta não houve alteração significativa quanto à variação do tipo de óleo utilizado. Os valores obtidos para

tamanho médio das gotículas foi cerca de 200 nm, com IPD inferior à 0,3 em todos os casos, indicando amostras com dispersão de tamanhos homogênea. O potencial zeta próximo aos +40 mV em todos os casos também indica que a mudança do óleo empregado ou adição dos fármacos não foram capazes de alterar o potencial elétrico resultante de superfície, se mantendo em valores desejáveis à aplicação proposta.

Quanto ao teor de fármaco recuperado e EE o tipo de óleo mostrou efeito sobre os resultados obtidos, principalmente no caso das NE contendo CUR. O TCM (Neobee<sup>®</sup> 1053, Stepan Company) é obtido a partir de glicerol de fontes naturais e ácidos graxos de cadeia média de óleos de coco e palmiste, contendo 44% de ácido cáprico (C10) e 55% caprílico (C8). Nesse óleo a CUR apresentou baixos valores de recuperação e EE, sendo possível observar a presença de precipitados, devido à baixa solubilidade da CUR em água ( $\log P \sim 3,2$ ) (ANAND et al., 2007; YANG et al., 2012a). Após a etapa de filtração, o fármaco não solubilizado foi retido obtendo como resultado formulações com teores reduzidos. Para a formulação F1<sub>CUR-10</sub>, somente 22,5% do fármaco em média foram recuperados, dos quais somente 58,7 % foram encontrados associados às gotículas de óleo, indicando uma reduzida capacidade desse óleo em solubilizar este fármaco. Takenaka e colaboradores (2013) avaliaram a solubilidade da CUR em TCM de proporções molares de ácido cáprico/caprílico (C10:C8) de 15:85 e 0:100 e obtiveram uma solubilidade de 1,8 – 2,0 mg/g, respectivamente, demonstrando também uma solubilidade limitada nesse óleo. Com base nesses resultados, uma formulação contendo 0,1 mg/mL de CUR (F2) foi desenvolvida, na qual apresentava uma proporção de 5 mg de CUR para cada 1g de TCM. Para essa formulação houve uma recuperação de cerca de 66,0 % com uma eficiência de encapsulação de 68,0 %.

Para as formulações contendo MEL em TCM (F3<sub>MEL-10</sub> e F4<sub>MEL-20</sub>) foram obtidos valores de recuperação > 90,0 %. Entretanto, a EE não ultrapassou cerca de 15,0 %, mesmo com o aumento da quantidade adicionada de MEL de 10 mg (F3) para 20 mg (F4). Esse resultado pode ser explicado pela solubilidade de MEL em água (até 2 mg/mL), que manteve uma alta recuperação, mesmo com pequena quantidade do fármaco solubilizado no TCM. Seu  $\log P$  de cerca 1,6 evidencia uma menor lipofilicidade em relação à CUR, refletindo na baixa EE (FILALI et al., 2017). Estes resultados corroboram com os encontrados por Schaffazick; Pohlmann e Guterres (2007), os quais descrevem valores de eficiência de encapsulação de  $33,0 \pm 2$  % para nanoemulsões e de até  $50,0 \pm 2$  % para nanocapsulas preparadas com uma concentração de 1,5 mg/mL de fármaco nas formulações.

O OR é extraído das sementes de mamona (*Ricinus communis* L.), sendo um TCL cujo principal componente é o ácido ricinoleico (~ 90%), um ácido carboxílico monoinsaturado com 18 carbonos (MENSAH; AWUDZA; O'BRIEN, 2018; ZORZI et al., 2017). Quando esse óleo foi utilizado houve o aumento na recuperação de CUR das formulações, bem como na EE para ambos os fármacos. A recuperação da CUR na F5<sub>CUR-10</sub> (quantidade inicial de 10 mg) foi de  $30,6 \pm 2,0$  % e na F6<sub>CUR-2</sub> (quantidade inicial de 2 mg) foi de  $86,8 \pm 3,1$  %, evidenciando uma maior solubilidade do fármaco na formulação, elevando a EE para 65,7% e 85,0%, respectivamente. O mesmo foi observado para a MEL, onde os valores de EE aumentaram para 20,5% (F7<sub>MEL-10</sub>) e 24,0% (F8<sub>MEL-20</sub>). A respeito dos óleos utilizados, é sabido que o tamanho da sua cadeia hidrocarbonada, bem como o grau de saturação de suas ligações afeta a capacidade de solubilização de alguns fármacos (BRUXEL et al., 2012). Além dos óleos, foi testada uma concentração superior (1 mM) e inferior (0,25 mM) de CTAB, afim de analisar se o mesmo poderia contribuir com o aumento de teor e EE, entretanto, não foi observada nenhuma alteração significativa quanto a esses parâmetros (dados não mostrados).

Nesse caso, diferenças na solubilidade dos fármacos testados expressos por seus Log *P*, podem explicar os diferentes valores de EE. A CUR é um fármaco mais lipofílico, portanto, encontra-se preferencialmente associado às gotículas da nanoemulsão, enquanto a MEL, por apresentar certa solubilidade em água encontra-se preferencialmente nessa fase. Diante desses resultados o óleo de rícino foi selecionado para constituir a fase oleosa das formulações e as quantidades iniciais dos fármacos foram fixadas em 2 e 10 mg, o que corresponde a concentrações teóricas de 0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL de CUR e MEL, respectivamente.