

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

LUIZA PEIXOTO DOS SANTOS CAVALCANTE

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME MUCOADESIVO
BUCAL CONTENDO METOTREXATO PARA TRATAMENTO DO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL

JOÃO PESSOA

2023

LUIZA PEIXOTO DOS SANTOS CAVALCANTE

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME MUCOADESIVO
BUCAL CONTENDO METOTREXATO PARA TRATAMENTO DO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Biomedicina, da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção do grau
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

JOÃO PESSOA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376d Cavalcante, Luiza Peixoto dos Santos.

Desenvolvimento e caracterização de filme mucoadesivo bucal contendo Metotrexato para tratamento do Carcinoma Epidermoide Oral / Luiza Peixoto dos Santos Cavalcante. - João Pessoa, 2023.

38 f. : il.

Orientador : Paulo Rogério Ferreti Bonan.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. 2. Metotrexato. 3. Liberação controlada de fármacos. I. Bonan, Paulo Rogério Ferreti. II. Título.

UFPB/CCS

CDU 616-006.6:611.91

LUIZA PEIXOTO DOS SANTOS CAVALCANTE

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME MUCOADESIVO
BUCAL CONTENDO METOTREXATO PARA TRATAMENTO DO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Biomedicina, da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção do grau
de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 02-06-2023

BANCA EXAMINADORA



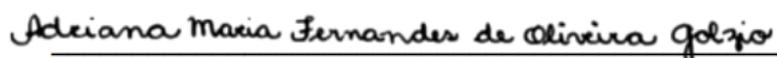
Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan (Orientador)

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof^ª. Dr^ª. Joelma Rodrigues de Souza

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof^ª. Dr^ª. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

DEDICATÓRIA

Ao meu amado vovô Raimundo (*In Memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Maria Alice e Evaldo, que sempre incentivaram meus estudos, acreditaram em mim e acompanharam todo meu esforço. Obrigada pela confiança, paciência e carinho de vocês.

Aos meus irmãos, Thais e Arthur, pela força que me transmitem nos momentos mais difíceis e me lembram que sempre os terei ao meu lado.

Ao meu namorado, Igor, pelo amor, incentivo e companheirismo.

Ao restante da minha família, em especial, à minha madrinha, Maria de Lourdes e à minha tia Vânia pelo interesse e apoio ao longo deste percurso.

Aos amigos queridos que o curso me proporcionou, e que desejo levar para vida inteira. Carol, minha dupla nesta jornada acadêmica, juntas desde o primeiro dia de aula ao último dia de estágio, Alan e Malu, obrigada por todo apoio e generosidade, vocês são especiais.

Aos meus colegas de turma, que tornaram os dias mais leves e agradáveis.

A Isis e Panmella, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste e de outros projetos.

Ao meu orientador, Paulo Rogério Ferreti Bonan, pela oportunidade de participar da iniciação científica e pela constante disponibilidade e apoio.

Aos meus amigos que direta ou indiretamente, contribuíram para tornar possível a execução deste trabalho.

RESUMO

O carcinoma epidermoide representa mais de 90% das neoplasias malignas orais, com etiologia multifatorial e seu risco aumenta com a idade, especialmente entre os homens. O metotrexato (MTX) é um dos agentes quimioterápicos mais estudados e eficazes disponíveis para o tratamento de diversos tumores. Uma maneira de contribuir para o sucesso do tratamento quimioterápico dá-se através da incorporação de fármacos a polímeros bucoadesivos, que aumentam o tempo de contato da formulação com a mucosa, melhorando a biodisponibilidade da droga, além de aumentar sua eficácia farmacocinética e diminuir sua toxicidade. Este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar filme polimérico mucoadesivo bucal para liberação controlada de metotrexato no tratamento do carcinoma epidermoide oral. Os filmes foram preparados através do método *casting* e diferentes formulações foram testadas incorporando o MTX, nas concentrações de 0,1%, 0,2%, 3% e 4,5% (v/v). As características macroscópicas e físico-químicas dos filmes foram analisadas *in vitro* através do potencial hidrogeniônico (pH), resistência dobrável, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria diferencial de varredura (DSC), além do ensaio de liberação *in vitro* e de viabilidade celular. Os resultados mostraram que as formulações produzidas apresentaram boas características macroscópicas e propriedades físico-química favoráveis, sendo assim, podendo ser considerados como uma alternativa promissora no tratamento do carcinoma epidermoide oral.

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. metotrexato. liberação controlada de fármacos

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma accounts for 90% of oral malignancies, with a risk of multifactorial evidence plus its increased risk with age, especially among men. Methotrexate (MTX) is one of the most studied and effective chemotherapeutic agents available for the treatment of various tumors. A way of treatment for successful chemotherapy is through the incorporation of drugs into polymers, which increases the time of addition of toxicity to the mucosa, improving the effectiveness of the drug, in addition to increasing its kinetic efficiency and decreasing. This study aimed to develop and characterize the oral mucoadhesive film for controlled release of methotrexate in the treatment of oral squamous cell carcinoma. The films were prepared through casting and different formulations and methods were tested incorporating MTX, in the forms of 0%, 0,1% 0,2%, 3%, 4,5% (v/v). The macroscopic physical characteristics and spectrochemical of the films, were evaluated through the hydrogenionic potential (pH), bendable resistance, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and *in vitro* drug release studies. The results presented that the formulations produced showed good macroscopic characteristics and favorable physicochemical properties, therefore, they can be considered as a promising alternative in the treatment of oral squamous cell carcinoma.

Key-words: squamous cell carcinoma of head and neck. methotrexate. drug liberation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1	Lesão endofítica em palato duro.....	13
Figura 2	Lesão exofítica em borda lateral de língua.....	13
Figura 3	Lesão eritroleucoplásica em borda lateral posterior de língua.....	14
Figura 4	Radiolucidez irregular, em forma de “roído de traça” com margens irregulares.....	14
Figura 5	Pérolas de ceratina.....	14
Figura 6	Atipia celular.....	14
Figura 7	Estrutura do Metotrexato e do ácido fólico, respectivamente.....	16
Figura 8	Mecanismo de ação do Metotrexato.....	16
Figura 9	HPMC.....	20
Figura 10	HPMC dissolvido em água e sob agitação a temperatura de $\pm 50^{\circ}\text{C}$...	20
Figura 11	Solução em repouso por 2 horas.....	20
Figura 12	Solução após adição do glicerol.....	20
Figura 13	Solução após adição do MTX.....	21
Figura 14	Soluções no dessecador por 24 horas.....	21
Figura 15	Placas com soluções na estufa.....	21
Figura 16	Filme seco.....	21
Figura 17	Filme produzido.....	24
Figura 18	Filme produzido.....	24
Figura 19	Potencial hidrogeniônico (pH) da superfície dos filmes obtidos.....	25
Figura 20	FTIR das amostras controle, L1 e L2, L3 e L4.....	27
Figura 21	DSC das amostras controle, L1 e L2, L3 e L4.....	28
Figura 23	Liberação de MTX em função do tempo.....	29

Figura 24	Ensaio de viabilidade celular (24h).....	30
Figura 25	Ensaio de viabilidade celular (48h).....	31

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1.	CÂNCER ORAL.....	12
2.2.	CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL.....	12
2.3.	TRATAMENTOS PARA O CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL	15
2.4.	METOTREXATO (MTX).....	16
2.5.	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	17
2.6.	FILMES MUCOADESIVOS BUCAIS.....	18
3.	OBJETIVOS.....	19
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1.	PRODUÇÃO DOS FILMES MUCOADESIVOS.....	19
4.2.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES MUCOADESIVOS.....	21
4.2.1.	Aspecto visual.....	21
4.2.2.	pH da superfície	21
4.2.3.	Resistência dobrável	23
4.2.4.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (TIR).....	23
4.2.5.	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	23
4.3.	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	23
4.4.	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	23
4.4.1.	Cultivo celular.....	23
4.4.2.	Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	23

4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICO	24
5.1.1	Aspecto visual.....	25
5.1.2.	pH da superfície.....	26
5.1.3.	Resistência dobrável.....	26
5.1.4.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	27
5.1.5.	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	27
5.2.	ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	28
5.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	29
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

O câncer oral figura-se entre os mais comuns do mundo (FERLAY *et al.*, 2021). No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer na cavidade oral aparece entre as seis neoplasias com maior número de casos entre indivíduos do sexo masculino (INCA, 2023). O carcinoma epidermoide representa mais de 90% das neoplasias malignas orais, com etiologia multifatorial e seu risco aumenta com a idade, especialmente entre os homens (SANTOS *et al.*, 2022; NEVILLE *et al.*, 2016).

O manejo das neoplasias da cavidade oral é complexo, devido às implicações funcionais e estéticas do tratamento dos tumores dessa região (WONGE e WIESENFELD, 2018). Dessa forma, o tratamento pode envolver uma terapia multimodal, principalmente através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (VALER *et al.*, 2020).

O metotrexato (MTX), um fármaco conhecido como análogo do ácido fólico, atua inibindo a ação de enzimas responsáveis pela síntese de nucleotídeos e, conseqüentemente, bloqueando a divisão celular (COUTINHO *et al.*, 2020). O MTX é amplamente utilizado na área oncológica adulta e infantil, sendo um dos agentes quimioterápicos mais estudados e eficazes disponíveis para o tratamento de diversos tumores (VALER *et al.*, 2020). No entanto, limitações como o risco de toxicidade, a tolerância ao medicamento associado a efeitos colaterais, a baixa solubilidade aquosa e a meia-vida curta, causadas principalmente pela forma como é administrado, restringem suas aplicações terapêuticas (MOURA *et al.*, 2020).

Nesse sentido, sistemas de entrega sólidos baseados em polímeros mucoadesivos podem ser retidos no interior da cavidade bucal, e, dessa forma, aumentam o tempo de contato da formulação com a mucosa, melhorando a biodisponibilidade da droga, além de aumentar sua eficácia farmacocinética e diminuir sua toxicidade (ABRUZZO *et al.*, 2020; DESAI *et al.*, 2011). Em particular, os filmes mucoadesivos bucais são considerados formulações adequadas, trazendo mais conforto, especialmente devido à sua espessura fina e fácil aplicação (ABRUZZO *et al.*, 2020).

Diante das limitações encontradas no tratamento quimioterápico convencional e considerando que estudos sobre os sistemas mucoadesivos bucais para liberação controlada de antineoplásicos ainda são pouco explorados pela literatura, a proposta do presente trabalho consiste no desenvolvimento e caracterização de um filme mucoadesivo bucal para liberação de metotrexato no tratamento do carcinoma epidermoide oral, a fim de aumentar a eficácia da droga, além de reduzir seus efeitos adversos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER ORAL

O termo “câncer” é utilizado para designar os diferentes tipos de neoplasias malignas, as quais apresentam o crescimento desordenado de células, e, dessa forma, são capazes de invadir com facilidade os tecidos adjacentes. Para isso, as células humanas progridem de um estado normal para um estado de crescimento neoplásico ao adquirirem um conjunto de habilidades funcionais, tais como a capacidade de manter sinais de crescimento, evitar os mecanismos supressores de crescimento, resistir à morte celular, manter a capacidade de replicação, ativar a formação de vasos sanguíneos, induzir a invasão e metástase, reprogramar o metabolismo celular e evitar a destruição pelo sistema imunológico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023; HANAHAN, 2022).

Em particular, o câncer oral apresenta incidência relativamente alta, sendo estimados 377.713 novos casos no mundo, em 2020, segundo dados do Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), elaborado pela International Agency for Research on Cancer (IARC) (FERLAY *et al.*, 2021; SUNG *et al.*, 2021). Grandes variações na prevalência e mortalidade entre as regiões podem estar relacionadas com os hábitos da população associados aos fatores de risco, expectativa de vida, acesso à informação, nível de capacitação de profissionais e rigor nos relatórios de doença (SANTOS *et al.*, 2022; NEVILLE *et al.*, 2016).

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa de novos casos de câncer na cavidade bucal para cada ano do triênio 2023-2025 é de 15.100, sendo 10.900 homens e 4.200 mulheres. Na Paraíba, estima-se 250 casos, sendo 170 acometendo o sexo masculino e 80 o sexo feminino, no ano de 2023 (INCA, 2023).

2.2 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

Os tumores malignos localizados na cavidade oral podem surgir de diversos subsítios, como mucosa bucal, língua, lábios, assoalho de boca, palato duro, rebordo alveolar e trígono retromolar (DE PAZ *et al.*, 2017). O carcinoma epidermoide, também chamado de carcinoma espinocelular ou carcinoma de células escamosas, é um tumor invasivo de mucosa ou pele revestidas por epitélio escamoso e representa mais de 90% das neoplasias malignas orais, enquanto os 10% restantes fazem parte das malignidades raras (variantes do carcinoma

epidermoide, melanomas, sarcomas e linfomas), além de uma variedade de tumores malignos de origem odontogênica (SANTOS *et al.*, 2022).

O carcinoma epidermoide acomete geralmente indivíduos de meia idade e de idade avançada do sexo masculino e apresenta uma etiologia multifatorial, com fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados. Nos fatores intrínsecos aparecem a genética e os estados sistêmicos ou generalizados do paciente, tais como deficiência nutricional ou desnutrição geral. Já nos fatores extrínsecos estão os estímulos químicos, incluindo o fumo e o álcool; biológicos, causados por microrganismos; e ambientais, como a radiação ultravioleta. Além disso, acredita-se que a associação de mais de um desses fatores seja necessária para produzir essa neoplasia (SANTOS *et al.*, 2022; HOWARD, AGRAWAL e GOOI, 2021; NEVILLE *et al.*, 2016).

O carcinoma epidermoide é caracterizado pela presença de lesões que podem assumir 5 formas principais: endofítica (Figura 1) (ulceração central, escavada e invasiva), exofítica (Figura 2) (verruciforme com aumento de volume), leucoplásica (mancha branca), eritoplásica (mancha vermelha) e eritoleucoplásica (Figura 3) (mancha branca e vermelha). Necrose, sangramento, friabilidade e submucosa enrijecida também podem ser observados. Além disso, pode haver acometimento dos ossos subjacentes, e a lesão pode ser observada radiograficamente como uma imagem radiolúcida, apresentando bordas irregulares e margens mal definidas (aspecto "em roído de traça") (Figura 4) (HOWARD, AGRAWAL e GOOI, 2021; JOHNSON *et al.*, 2020; NEVILLE *et al.*, 2016).

Figura 1 – Lesão endofítica em palato duro



Fonte: NEVILLE *et al.*, 2016

Figura 2 – Lesão exofítica em borda lateral de língua



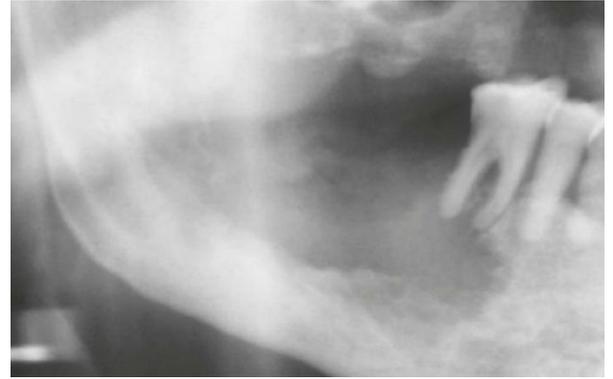
Fonte: NEVILLE *et al.*, 2016

Figura 3 – Lesão eritroleucoplásica em borda lateral posterior de língua.



Fonte: NEVILLE *et al.*, 2016

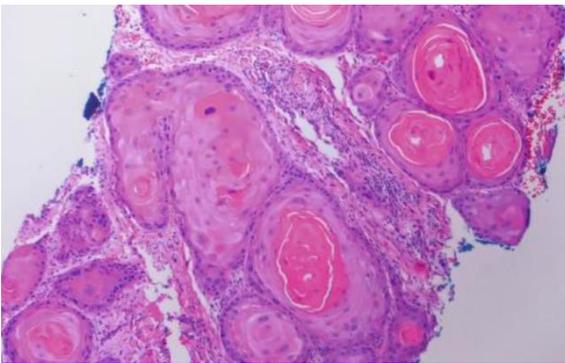
Figura 4 – Radiolucidez irregular, em forma “roído de traça” com margens mal definidas.



Fonte: NEVILLE *et al.*, 2016

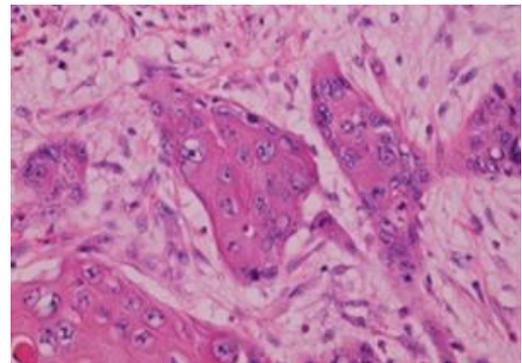
Histologicamente, é possível observar uma invasão de células epiteliais no tecido conjuntivo arranjadas em cordões e ilhas, além da formação de pérolas de ceratina (focos arredondados de camadas concêntricas de células queratinizadas) (Figura 5), infiltrado inflamatório crônico intenso e a presença de neoformação vascular (angiogênese). Além disso, as células apresentam atipia celular (Figura 6), entre as quais aumento do volume celular e nuclear, hiper cromasia, relação núcleo-citoplasma aumentada e presença de mitoses atípicas (JOHNSON *et al.*, 2020; DE PAZ *et al.*, 2017; NEVILLE *et al.*, 2016).

Figura 5 - Pérolas de ceratina.



Fonte: JOHNSON *et al.*, 2020

Figura 6 - Atipia celular



Fonte: DE PAZ *et al.*, 2017

O diagnóstico do carcinoma epidermoide é realizado através do exame clínico associado à análise da biópsia das lesões, principalmente quando são encontradas no assoalho da boca ou em borda lateral de língua, além da avaliação radiográfica em casos indicados. Além disso, o diagnóstico diferencial pode ser feito com infecções fúngicas profundas tais como a Histoplasmose, a Paracoccidiodomicose, doenças bacterianas como sífilis

e tuberculose, lesões orais da granulomatose de Wegener, úlceras traumáticas crônicas e doença de Crohn (NEVILLE *et al.*, 2016; ALMEIDA, 2016).

Dessa forma, a correta avaliação dos exames diagnósticos realizados ajuda a delinear melhor o tamanho do tumor e a extensão de possíveis metástases do carcinoma epidermoide oral, sendo esses os melhores indicadores do prognóstico do paciente. Além disso, é possível determinar o tratamento mais adequado, por meio de uma avaliação rigorosa e multidisciplinar, principalmente por se tratar de uma região que pode trazer sequelas estéticas e funcionais, comprometendo a reabilitação e a qualidade de vida do paciente (HOWARD, AGRAWAL e GOOI, 2021; JOHNSON *et al.*, 2020).

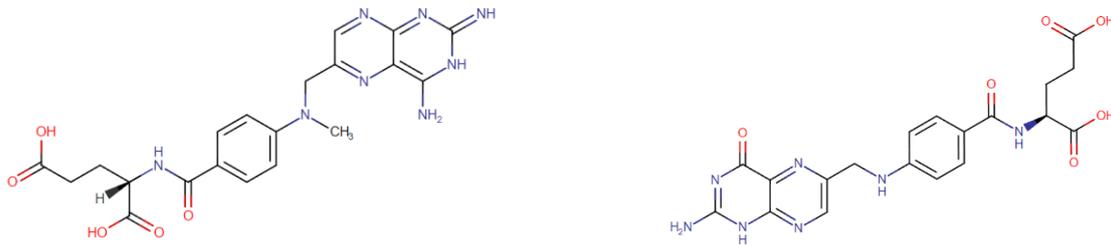
2.3 TRATAMENTOS PARA O CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

O tratamento pode ser realizado por meio de excisão cirúrgica ampla, radioterapia e quimioterapia, além de terapias específicas, que incluem anticorpos monoclonais ou inibidores de tirosina quinase dirigido contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e anticorpos antifator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O tratamento então deve ser ajustado de acordo com o tamanho e localização da lesão, estágio do câncer e fatores de risco, com regimes mais agressivos usados nas fases avançadas ou metastáticas da doença (VALER *et al.*, 2020; NEVILLE *et al.*, 2016).

Dentre as terapias realizadas, a quimioterapia refere-se ao tratamento do câncer por meio da administração de fármacos, podendo ser aplicados pelas vias oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intratecal e tópica (FORD, 2019). Os quimioterápicos frequentemente diminuem a velocidade de crescimento do tumor e retardam a ocorrência de metástase, combatendo a célula em uma ou mais fases da divisão celular (CHU e SARTORELLI, 2019; FORD, 2019). O tratamento pode ser diário, semanal ou mensal, sendo em sua maioria administrado em ciclos adaptados ao tipo de câncer, objetivo do tratamento e medicamento utilizado (BRASSIL, 2019).

Para o tratamento quimioterápico do carcinoma epidermoide oral, os medicamentos metotrexato (MTX), cisplatina, carboplatina, 5-Fluorouracil (5-FU), bleomicina, docetaxel e hidroxiureia são os mais comumente utilizados (CHAMOLI *et al.*, 2021). O MTX, conhecido como análogo do ácido fólico (Figura 7) pois atua inibindo seu metabolismo, foi um dos primeiros agentes utilizados contra o câncer devido a sua alta ação antineoplásica, e continua a ser usado extensivamente no tratamento de uma variedade de outros tumores, tanto na área oncológica adulta como na infantil (VALER *et al.*, 2020).

Figura 7 - Estrutura do MTX e do ácido fólico, respectivamente.

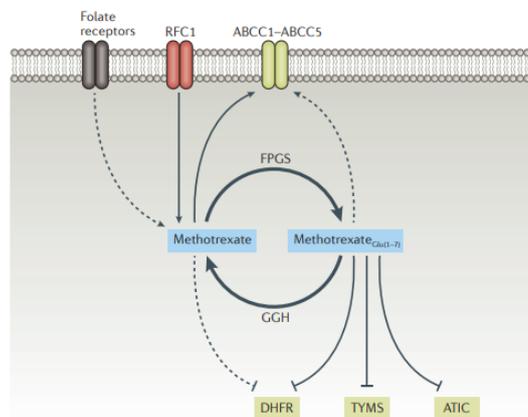


Fonte: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00563>. Acesso em: 28 mar. 2023

2.4 METOTREXATO (MTX)

O MTX está presente no grupo dos quimioterápicos antimetabólicos e sua absorção é governada principalmente pelo transportador de folato 1 (RFC1) com contribuição limitada dos receptores de folato. O efluxo celular de MTX é feito por transportadores da família ATP-binding cassette (ABCC). Dentro da célula, o MTX é poliglutamado em uma reação reversível governada por folilpoliglutamato sintetase (FPGS) e γ -glutamil hidrolase (GGH). A poliglutamação do MTX (produzindo metotrexatoGlu(1-7)) altera seu espectro de atividade, aumentando a inibição de diidrofolato redutase (DHFR), timidilato sintetase (TYMS) e 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase (ATIC) (Figura 7). A inibição dessas enzimas impossibilita uma série de reações, levando ao bloqueio da síntese de nucleotídeos DNA e RNA e, conseqüentemente, da divisão celular (CHU e SARTORELLI, 2019; BROWN, PRATT e ISAACS, 2016).

Figura 8 - Mecanismo de ação do MTX



Fonte: BROWN, PRAT e ISAACS, 2016

Apesar de eficaz, a administração do MTX pelos métodos convencionais de tratamento quimioterápico traz algumas desvantagens (LI *et al.*, 2017). A limitada solubilidade em fluidos aquosos, a baixa permeabilidade e a biodisponibilidade reduzida em doses acima de 25mg/kg, devido à saturação de seus transportadores, são apontadas como principais limitações da via de administração oral do MTX. A via intravenosa, por sua vez, leva à biodisponibilidade imediata e completa, no entanto, altas concentrações da droga acabam sendo entregues também às células saudáveis, causando danos aos tecidos e gerando reações adversas, tais como mucosite, diarreia, mielossupressão com neutropenia e trombocitopenia (CALIXTO *et al.*, 2014; CHU e SARTORELLI, 2019). A fim de reduzir essas desvantagens, sistemas de liberação controlada de fármacos surgiram como uma alternativa à terapia quimioterápica convencional (CALIXTO *et al.*, 2014).

2.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Os sistemas de liberação controlada de fármacos têm como principais objetivos aumentar a solubilidade e a estabilidade da droga e oferecer sua entrega seletiva com uma taxa e mecanismo previsíveis para órgãos, tecidos ou células específicas, sendo assim capazes de atuar diretamente no sítio da lesão. Dessa forma, é possível trazer efeitos farmacológicos ao local desejado, melhorando a biodisponibilidade, ampliando a liberação e minimizando a frequência de administração do fármaco, além de manter seus níveis plasmáticos dentro da janela terapêutica com o mínimo de efeitos colaterais (ADEPU *et al.*, 2021; JIN *et al.*, 2018; HENG, 2018).

O desenvolvimento de um sistema de liberação com o fármaco conjugado a um biomaterial compatível ajuda a modular a farmacocinética e aumentar a facilidade de entrega da droga. Um biomaterial é uma substância projetada para interagir com sistemas biológicos para fins terapêuticos ou diagnósticos, e podem ser polímeros, proteínas, lipídios, peptídeos e polissacarídeos, utilizados em escalas de comprimentos variados em diferentes rotas de aplicação, sendo selecionados de acordo com o tipo de formulação, local e via de liberação do fármaco. Além disso, deve ser biocompatível, biodegradável, não tóxico, preferencialmente hidrofílico e mucoadesivo, com boa resistência mecânica (ADEPU e RAMAKRISHNA, 2021; JIN *et al.*, 2018).

2.6 FILMES MUCOADESIVOS BUCAIS

Os polímeros mucoadesivos, assim denominados quando o substrato biológico é o muco, possuem vários grupos hidrofílicos capazes de interagir com a mucina por meio de pontes de hidrogênio, facilitando a liberação do fármaco pela via transmucosa (KUMAR *et al.*, 2020). Alguns polímeros possuem afinidade pela mucosa bucal, sendo capazes de aderir diretamente em sua superfície, e podem ser apresentados em forma de comprimidos, filmes, pomadas, discos, sistemas de multicamadas, microesferas e sistemas hidrogéis, possibilitando uma alternativa para formas farmacêuticas convencionais (PATHAN *et al.*, 2008; MOHAMMADI-SAMANI, BAHRI-NAJAFI e YOUSEFI, 2005).

Em particular, os filmes mucoadesivos bucais apresentam vantagens importantes, tais como sua elevada área de superfície capaz de aumentar o contato com a mucosa e, conseqüentemente, as interações entre o fármaco e a superfície biológica. Além disso, permitem a maior precisão da dose do medicamento e possuem espessura fina e maciez, tornando-os quase imperceptíveis, melhorando, assim, a adesão do paciente (PREZOTTI *et al.*, 2020).

Dentre os polímeros mais utilizados, o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) destaca-se como um biomaterial mucoadesivo de primeira geração biocompatível e biodegradável (ALOPAEUS *et al.*, 2020). Sua característica hidrofílica e capacidade de absorver água, resultando em um rápido inchamento, permitem que esse material possa atuar como um agente dispersante de drogas, principalmente devido a formação de um gel viscoso, sendo uma opção como componente de entrega controlada de fármacos (JIN *et al.*, 2018). Somado a isso, o glicerol pode atuar como agente plastificante, e quando utilizado na fabricação de filmes mucoadesivos bucais, promove alterações nas suas propriedades, evitando que o filme formado possua uma estrutura rígida e quebradiça, aumentando, assim, sua faixa de aplicação (GONÇALVES, 2019).

Dessa forma, o uso de filmes mucoadesivos bucais aparecem com alternativa promissora para liberação controlada de variados tipos de fármacos e estudos com essa abordagem cresceram nos últimos anos. ABRUZZO *et al.* (2020) desenvolveram filmes bucais mucoadesivos com prebióticos para tratamento de patologias orais; JOVANOVIĆ *et al.* (2021) produziram filmes mucoadesivos carregados com propranolol no tratamento de doenças cardiovasculares; NAIR *et al.* (2021) sintetizaram um sistema de administração bucal de rizatriptano para o tratamento de enxaquecas (ABRUZZO *et al.*, 2020; JOVANOVIĆ *et al.*, 2021; NAIR *et al.*, 2021). No entanto, estudos que abordem sistemas de liberação controlada

de quimioterápicos ainda são escassos na literatura. Diante disso, este trabalho busca desenvolver um filme mucoadesivo bucal para o tratamento do carcinoma epidermoide oral.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- a) Desenvolver e caracterizar filme polimérico mucoadesivo contendo metotrexato para tratamento do carcinoma epidermoide oral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir os filmes mucoadesivos contendo metotrexato;
- b) Caracterizar físico-quimicamente os filmes mucoadesivos contendo metotrexato;
- c) Realizar o ensaio de liberação *in vitro* do fármaco presente nos filmes mucoadesivos;
- d) Analisar a viabilidade celular dos filmes incorporados com metotrexato.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DOS FILMES MUCOADESIVOS

Os filmes poliméricos mucoadesivos foram preparados através de *casting*, que consiste no preparo de uma solução, seguido de evaporação do solvente de fundição em estufa. Foi utilizado a Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (Bandeirante Brazmo Química, Brasil) como agente filmógeno, o glicerol (Sigma-Aldrich, Brasil) como agente plastificante, álcool etílico 96% P.A. (Dinâmica, Brasil) e água destilada (SS Plus, Brasil) como solventes e o metotrexato (Hytas) como agente quimioterápico.

Inicialmente, o HPMC (0,8% m/v) (Figura 9) foi dissolvido em 80mL de água destilada sob agitação a temperatura de $\pm 50^{\circ}\text{C}$ (Figura 10), permanecendo em repouso por 2 horas (Figura 11). Após esse período, o glicerol (0,15% v/v) foi adicionado à solução de HPMC sob agitação por 30 min (Figura 12). O fármaco foi diluído em 10mL de álcool etílico e adicionado à solução obtida, permanecendo em agitação durante 30 minutos (Figura 13). Em seguida, a solução foi colocada no dessecador durante 24 horas (Figura 14), vazadas em placas de Petri de plástico e secadas na estufa a 50°C (Figuras 15 e 16).

Foram selecionadas 4 concentrações do fármaco para produção dos filmes poliméricos mucoadesivos: 0,1% (L1), 0,2% (L2), 3% (L3) e 4,5% (L4) (v/v). Inicialmente foram produzidas as concentrações L1 e L2, escolhidas baseadas em estudos *in vitro* com MTX (PATHAK *et al.*, 2007; PAI *et al.*, 2009). Em seguida, as concentrações L3 e L4 foram escolhidas a partir de doses do fármaco já comumente utilizadas no tratamento do câncer (DESHPANDE, NANDU, e JADHAV, 2019).

Figura 9 - HPMC.



Fonte: autoria própria.

Figura 10 - HPMC dissolvido em água e sob agitação a temperatura de $\pm 50^{\circ}\text{C}$.



Fonte: autoria própria.

Figura 11 - Solução em repouso por 2 horas.



Fonte: autoria própria.

Figura 12 - Solução após adição do glicerol.



Fonte: autoria própria.

Figura 13 - Solução após adição do MTX.



Fonte: autoria própria.

Figura 14 - Soluções no dessecador por 24 horas.



Fonte: autoria própria.

Figura 15 - Placas com soluções na estufa.



Fonte: autoria própria

Figura 16 - Filme seco.



Fonte: autoria própria

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES MUCOADESIVOS

4.2.1 Aspecto visual

O aspecto visual do filme foi avaliado baseando-se nos critérios de homogeneidade, flexibilidade, adesividade, uniformidade da cor, solubilidade e fragilidade.

4.2.2 pH da superfície

O potencial hidrogeniônico (pH) da superfície dos filmes foi verificado empregando-se o método proposto por Salehi e Boddohi (2019) (SALEHI; BODDOHI, 2019) Inicialmente, os filmes foram cortados na dimensão 1 x 1 cm² e mantidos em 5mL de água destilada por 10 min para aumentar de volume. O medidor de pH (PH700, Apera Instruments)

foi utilizado para determinar o pH da superfície, o qual foi mensurado em triplicata, a partir da aposição da sonda de pH na superfície de cada filme permanecendo durante um minuto.

4.2.3 Resistência dobrável

A resistência dobrável do filme foi verificada através do método de dobramento repetido em região especificada de cada filme (KARKI *et al.*, 2016; SALEHI e BODDOHI, 2019). Os filmes foram cortados na dimensão 2 x 1 cm² e a região de dobramento formava um ângulo de 180°. O valor da resistência dobrável do filme foi determinado pelo número de vezes que cada fragmento pode ser dobrado em região específica sem quebrar. O ensaio foi realizado em triplicata, no qual cada amostra foi submetida a 600 repetições.

4.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos usando um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (IRPrestige-21, Shimadzu, Japão) com 64 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹ de 400-4,000 cm⁻¹, na forma de filme.

4.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (Differential Scanning Calorimetry – DSC) foi utilizada para análise do perfil calorimétrico. As mensurações foram realizadas no analisador térmico SHIMADZU DSC 60 Plus mediante aquecimento das amostras numa taxa de 10°C/min de 35°C a 200°C sob atmosfera gás argônio inerte, com vazão de gás de 50mL/min.

4.3 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Para o ensaio de liberação *in vitro* do MTX, os filmes produzidos (LI, L2, L3, L4 e CONTROLE) foram cortados em pedaços de 1x2 cm² e transferidos para tubos tipo Falcon contendo 50 mL de PBS (pH 6,8). Em intervalos de tempo predeterminados de 1h, 2h, 4h, 6h e 8h, alíquotas de 1 mL do meio de liberação foram retiradas e a densidade ótica (DO) foi determinada através do espectrofotômetro UV-VIS, a partir da construção da curva padrão (220 a 400 nm) realizada com o MTX (25mg/ml) em diferentes concentrações (KHODADADEI, SAFARIAN e GHANBARI, 2017; SUN, 2017 *et al.*, 2017).

4. 4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

4.4.1 Cultivo celular

Células VERO (ATCC CCL81), provenientes de rim de macaco verde africano, foram cultivadas em meio MEM – Minimum Essential Media - (Gibco) suplementado com 5% de SFB (Gibco), L-Glutamina 2mM (Gibco) e penicilina/estreptomicina/anfotericina B 100U/mL (Gibco) para fins de utilização nos ensaios de viabilidade celular.

4.4.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT

O método de redução do MTT (2H-Tetrazolium, 2-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-3,5-difenil,bromide) foi utilizado para avaliação da toxicidade celular (MOSMANN, 1983). As células VERO (ATCC CCL81), foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^5 células/poço) e incubadas por 24 h após o plaqueamento. Após a primeira incubação, o meio de cultura MEM foi aspirado e repostado em um volume de 100µL juntamente com os estímulos: discos dos filmes com 3mm de diâmetro que foram cortados com punches dermatológicos.

Foi utilizado como branco, poços apenas com o meio de cultura, como controle negativo as células sem estímulo em meio de cultura e como controle positivo, o meio de cultura com 10% de DMSO. Além disso, foi adicionado um poço com MTX livre com 25mg/ml para efeitos comparativos com os filmes. Novamente, a placa foi incubada por 24h na estufa de 5% de CO₂ a 37°C.

Após 24h, os poços foram visualizados em microscópio invertido e os registros fotográficos foram obtidos. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e os poços foram lavadas com PBS 1x e adicionou-se 100uL de MTT (5mg/mL) previamente diluído em DMEM com vermelho de fenol e com suplementação de 5%. Quatro horas depois, retirou-se o conteúdo total da placa e 100µL de DMSO foram adicionados em cada poço. A placa foi então levada para agitação em shake orbital por 10 minutos para homogeneizar os poços com DMSO e auxiliar na dissolução dos cristais de Formazan. Por fim, a absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 570nm em espectrofotômetro. O mesmo processo foi repetido após 48h de incubação.

Para a interpretação dos resultados e cálculos de viabilidade realizou-se a média da absorbância (Abs) das triplicatas de cada uma das amostras avaliadas, controles positivo e negativo e branco, e aplicou-se na seguinte fórmula.

$$\text{VIABILIDADE(\%)} = 100 \times \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle negativo}}$$

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do FTIR, DSC e da liberação *in vitro* foram plotados em gráficos no OriginLab®.

Os resultados dos testes de pH da superfície e viabilidade celular foram plotados no Excel®.

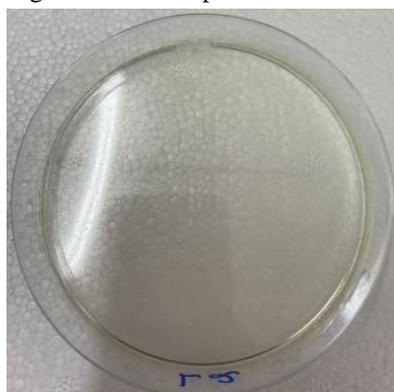
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES MUCOADESIVOS

5.1.1 Aspecto visual

Os filmes L1, L2, e L3 produzidos apresentaram aspectos homogêneo, flexível, aparente adesividade, de cor uniforme, levemente amarelado devido à cor característica do fármaco. Além disso, não foram observadas partículas insolúveis, bolhas e sinais de ruptura ou áreas frágeis (Figuras 17 e 18). O filme L4, por possuir uma maior concentração de fármaco, apresentou cor fortemente amarelada e a presença algumas bolhas.

Figura 17 - Filme produzido.



Fonte: autoria própria

Figura 18 - Filme produzido.



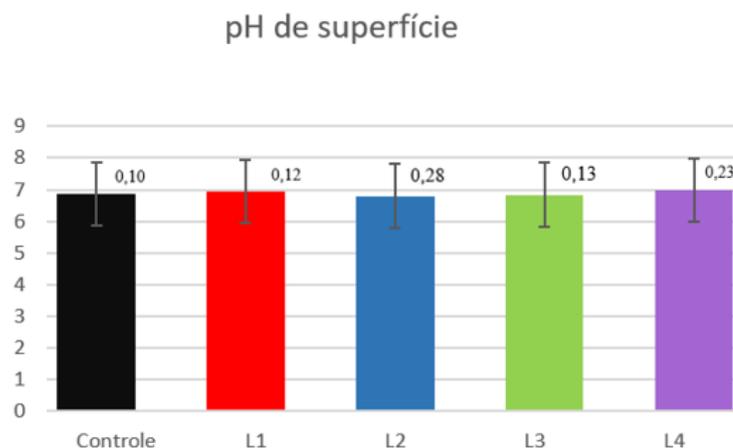
Fonte: autoria própria

5.1.2 pH da superfície

O pH da superfície de um material é medido com o intuito de estabelecer a compatibilidade com o pH fisiológico do seu local de aplicação (SALEHI e BODDOHI, 2019). O pH da saliva, em adultos, mantém-se na faixa de 6,2 a 7,4, devido ao eficiente sistema tampão composto principalmente pelos íons bicarbonato (HCO_3^-) e fosfato (PO_4^{3-}) (HALL, 2021). Dessa forma, caso apresentem pH muito ácido ou alcalino, os filmes produzidos podem causar reações na mucosa bucal, além de influenciar no grau de hidratação dos polímeros (KUMRIA *et al.*, 2016; BAHRI-NAJAFI, R. *et al.*, 2014).

O gráfico 1 apresenta valores médios do pH da superfície dos filmes controle, L1, L2, L3, L4, respectivamente: $6,87 \pm 0,10$, $6,95 \pm 0,28$, $6,80 \pm 0,12$, $6,84 \pm 0,13$, $6,97 \pm 0,23$ (Figura 19). Os resultados demonstram que o pH da superfície de todos os filmes encontra-se próximo ao pH neutro, indicando sua compatibilidade com o pH bucal (6,2-7,4), e, dessa forma, nenhuma irritação à mucosa é esperada para este material, facilitando a adesão do paciente. As medidas do pH mensuradas neste estudo foram semelhantes às encontradas em outras formulações de filmes poliméricos mucoadesivos (BAHRI-NAJAFI, R. *et al.*, 2014; SALEHI e BODDOHI, 2019; ZAMAN, HANIF e SHAHERYAR, 2018; SALEHI e BODDOHI, 2019; NAIR *et al.*, 2020; ALVES *et al.*, 2020; DI PRIMA, CAMPISI e DE CARO, 2021).

Figura 19 - Potencial hidrogeniônico (pH) da superfície dos filmes obtidos.



Fonte: autoria própria

5.1.3 Resistência dobrável

A resistência dobrável dos filmes poliméricos mucoadesivos é medida para determinar sua resistência mecânica, ou seja, a capacidade do material em resistir à esforços externos, sem sofrer deformações permanentes ou rupturas. Um filme quebradiço pode fragmentar logo após a aplicação ou durante o uso, o que pode levar à irritação mecânica, causando desconforto ao paciente, além de afetar a liberação do fármaco (SALEHI e BODDOHI, 2019; KOLAND *et al.*, 2011).

Os resultados indicaram que nenhuma das formulações apresentou sinais de ruptura ou quebra durante o teste, o que representa boa flexibilidade e resistência ao dobramento adequada (>300), indicando, assim, que o filme produzido é capaz de adequar-se aos contornos da cavidade oral após sua aplicação. Os resultados obtidos estão em conformidade a outras formulações poliméricas mucoadesivas (SALEHI e BODDOHI, 2019; KOLAND *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2020; ZAMAN, HANIF e SHAHERYAR, 2018; SEMALTY, SEMALTY e KUMAR, 2008; PAMLÉNYI, *et al.*, 2022).

5.1.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

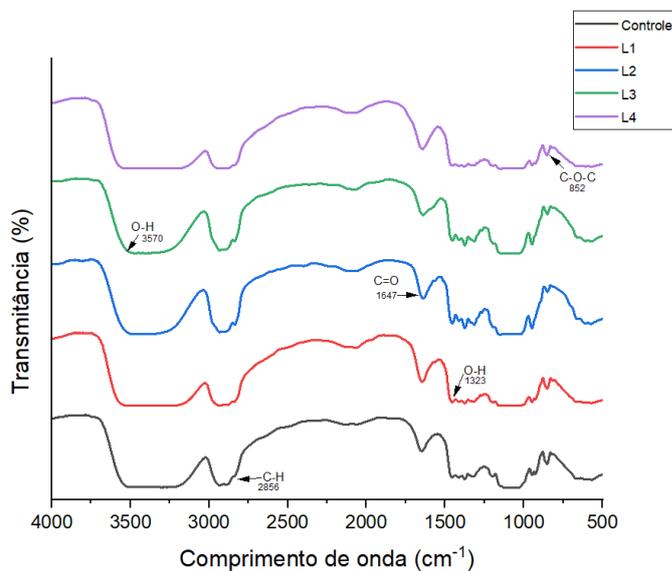
O FTIR é uma técnica utilizada para caracterizar e identificar a estrutura química e as ligações moleculares de uma amostra, baseando-se na interação de radiação infravermelha com as moléculas presentes nos compostos. Os espectros de FTIR dos filmes produzidos são apresentados na Figura 20, onde foi possível a observação das bandas de absorção características dos principais compostos de interesse.

Em todas as formulações estudadas foram observados picos característicos do HPMC, como a vibração de flexão do grupo O-H, no comprimento de onda 1323 cm^{-1} ; a vibração de estiramento do grupo C-H, no comprimento de onda 2856 cm^{-1} ; e a vibração de alongamento do grupo C-O-C, no comprimento de onda 852 cm^{-1} . A banda de comprimento de onda em 3570 cm^{-1} indica a frequência de estiramento do grupo O-H do polímero, como também pode evidenciar a presença do MTX, correspondente à sobreposição de grupos amina primária e hidroxila nessa mesma faixa de absorção. Há também o pico no comprimento de onda 1647 cm^{-1} do grupo C=O, que pode representar o estiramento dos grupos carboxílico e amida do MTX (Figura 20).

Os resultados dos espectros obtidos são semelhantes aos encontrados por LU *et al.* (2019), DAS, PANDA e PAL (2012), LATIF *et al.* (2021), PEREIRA *et al.* (2013). A

semelhança entre os picos da amostra controle e as amostras com o MTX (L1, L2, L3 e L4) confirmam a ausência de interações físico-químicas entre os compostos, indicando que o fármaco foi incorporado nos filmes (MEHER, et al., 2013).

Figura 20 - FTIR das amostras controle, L1, L2, L3 e L4.



Fonte: autoria própria.

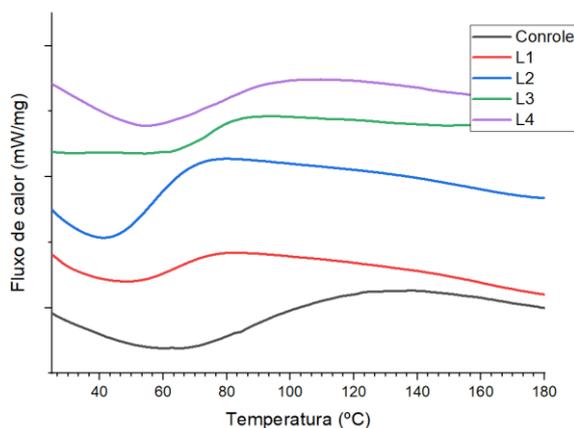
5.1.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O DSC é uma técnica utilizada para avaliar as propriedades térmicas de materiais, a partir da medição da diferença de fluxo de calor entre uma amostra e uma referência, enquanto ambas são submetidas a um programa de aquecimento ou resfriamento controlado. Os termogramas DSC dos filmes L1 e L2 produzidos são apresentados na Figura 21. Na formulação controle, na qual o filme foi produzido sem o MTX, é possível observar um amplo pico endotérmico entre as temperaturas de 50 e 115°C, evidenciando a presença do polímero HPMC no material (TIMUR *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2021) (Figura 21). Já nas curvas dos filmes produzidos com diferentes concentrações de MTX pode-se observar que houve apenas pequenas alterações nas temperaturas dos seus picos. Sendo assim, espera-se que o material se mantenha estável à temperatura ambiente (25°C) e na cavidade bucal (36,8°C) (Figura 22).

É importante destacar que a compatibilidade entre fármaco e excipientes pode ser avaliada observando o comportamento térmico de compostos como surgimento ou desaparecimento de um pico endotérmico ou exotérmico. Dessa forma, como não houve

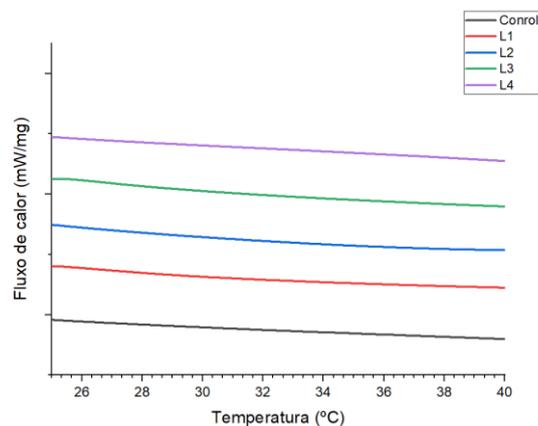
grandes alterações nos eventos endotérmicos nos filmes com MTX, quando comparados aos filmes controle, pode-se afirmar que não foi encontrada incompatibilidade entre o fármaco e o polímero utilizado (KHAN *et al.*, 2017).

Figura 21 - DSC das amostras controle, L1 e L2, L3 e L4.



Fonte: autoria própria.

Figura 22 – DSC das amostras L1, L2, L3 e L4, estáveis entre 25 e 40°C.



Fonte: autoria própria.

5.2 ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

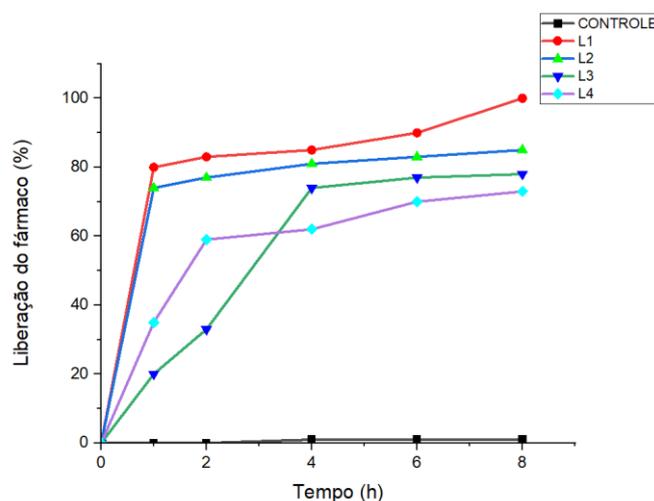
Estudos de liberação de fármacos *in vitro* são realizados a fim de mensurar a quantidade de fármaco presente no filme polimérico que será liberada na mucosa bucal, e subsequente permeação através desta membrana biológica, em intervalos de tempo determinados (LI *et al.*, 2020). Os valores foram obtidos a partir da medição da densidade ótica no meio de liberação. Segundo a lei de Lambert-Beer, a densidade ótica de substâncias químicas absorvedoras em uma solução, mensuradas por espectrometria, é diretamente proporcional à concentração dessa substância (CANASSA, LAMONATO e RIBEIRO, 2018). Com isso, foi possível determinar a quantidade de fármaco liberada pelos filmes mucoadesivos no meio em função do tempo. Os resultados mostram que os filmes L1, L2, L3 e L4 liberaram a maior parte do fármaco nos primeiros intervalos de tempo, apresentando, em seguida, uma liberação mais lenta e contínua (Figura 23).

Os resultados dos filmes mostram que a liberação do MTX parece ser realizada de forma bimodal ou sigmoideal, a qual acontece em duas fases distintas (ALVES, 2011). A primeira fase consiste em uma liberação acelerada (“burst effect”), que pode ser explicada

devido a uma parte do fármaco, durante o processo de secagem, migrar para a superfície do filme. Essa liberação crescente no início pode ser considerada benéfica, uma vez que permite que o fármaco atinja sua faixa de concentração terapêutica (FERNANDES *et al.*, 2018).

Já a segunda fase da liberação é caracterizada pela liberação lenta, justificada pela capacidade do polímero HPMC de absorver água do meio, inchar e formar um gel viscoso. Somado a isso, a presença do glicerol, composto hidrofílico e de baixo peso molecular, promove o relaxamento das cadeias poliméricas durante o estágio inicial do intumescimento, resultando na formação de novos canais na matriz, facilitando a difusão da droga. Esses processos criam um caminho mais longo para a difusão do fármaco, diminuindo sua taxa de liberação e garantindo a manutenção da droga na sua janela terapêutica (UZUNOĞLU *et al.*, 2021, FERNANDES *et al.*, 2018; ALVES, 2011). O perfil de liberação do fármaco determinado no estudo foi semelhante aos encontrados por TAGHE *et al.* (2020), DINTE *et al.*, (2023), ABDEL-HAQ (2021) e FERNANDES (2018).

Figura 23 - Liberação do MTX em função do tempo.



Fonte: autoria própria.

5.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de viabilidade celular por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo) é um dos métodos colorimétricos mais comuns e amplamente utilizados para determinar a viabilidade e a proliferação celular. Esse teste é baseado no fato de que células viáveis com metabolismo ativo são capazes de converter o sal de tetrazólio de MTT em formazan, um produto de cor púrpura e insolúvel em água. Quando as células morrem,

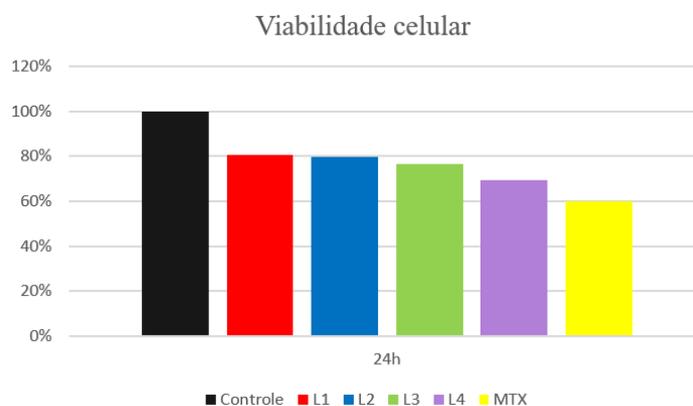
elas perdem essa capacidade, sendo, portanto, a formação de cor um marcador característico apenas das células viáveis (ASLANTÜRK, 2018).

O teste de citotoxicidade foi realizado a fim de investigar se os filmes mucoadesivos produzidos geram a morte de células não-tumorais, sendo utilizadas as células VERO (ATCC CCL81), recomendadas pela ISO 10993-5 para ensaios de viabilidade celular (ISSO, 2009). Como esperado, o controle do filme mucoadesivo, sem o fármaco, não induziu a perda de viabilidade celular. Já os poços com os filmes L1, L2, L3, L4 e MTX livre apresentaram 80,52%, 79,9%, 76,65%, 69,41% e 60% respectivamente, de células viáveis em 24h (Figura 24). Após 48h, os poços com filmes controle, L3 e L4 indicaram taxas de viabilidade de 100%, 75,82% e 69,38%, respectivamente (Figura 25).

Os resultados mostram que todas as formulações causaram a redução da viabilidade celular, quando comparados ao filme controle (0%). No entanto, pode-se observar que os valores encontrados para L1, L2, L3 e L4 não indicam efeitos citotóxicos significativos, uma vez que o ensaio resultou em boas proporções de células funcionais (>70%) (MOSMANN, 1983), além de se mostrarem menos tóxicos que o fármaco livre.

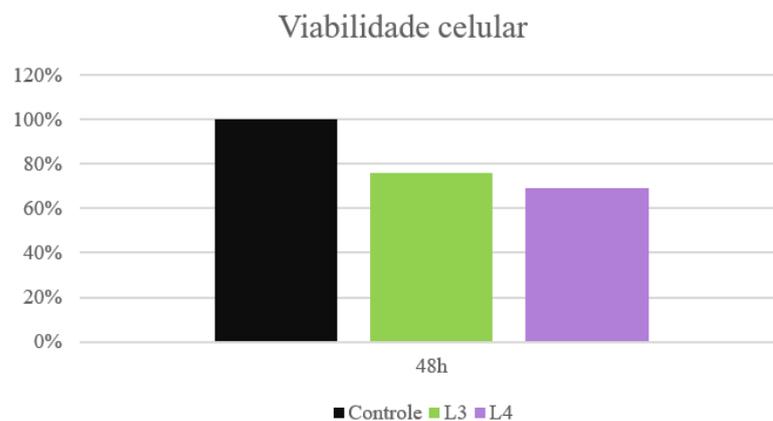
Dessa forma, o ensaio de viabilidade celular pode ser utilizado para demonstrar a uma maior ligação dos filmes contendo MTX nas células neoplásicas. Isso acontece devido à algumas células tumorais serem capazes de superexpressarem o receptor de folato, permitindo que o fármaco seja seletivamente captado por essas células, sendo internalizado através da endocitose mediada pelo receptor e inibindo a atividade da enzima a diidrofolato redutase, levando à interrupção do seu ciclo e à indução da morte celular (YU *et al.*, 2020; YOUNG *et al.*, 2008).

Figura 24 – Viabilidade celular (24h).



Fonte: autoria própria.

Figura 25 – Viabilidade celular (48h).



Fonte: autoria própria.

6 CONCLUSÃO

O estudo obteve sucesso na produção dos filmes poliméricos mucoadesivos bucais contendo MTX em diferentes concentrações (0,1%, 0,2 3% e 4,5%). Além disso, os resultados mostraram que as formulações produzidas apresentaram boas características visuais, propriedades físico-químicas compatíveis com a mucosa oral, perfil de liberação do fármaco adequado e viabilidade celular favorável, podendo, assim, ser considerados como uma alternativa promissora no tratamento do carcinoma epidermoide oral. Dessa forma, testes futuros visando à análise da viabilidade celular em linhagens tumorais e ensaio de mucoadesividade *ex vivo* são propostos para finalizar a primeira etapa da pesquisa, para que os teste *in vivo* sejam iniciados.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAQ, Muhammad *et al.* Biomimetic clotrimazole-loaded PLGA films with enhanced adhesiveness for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 120578, 2021.

ABRUZZO, A. *et al.* Mucoadhesive buccal films for local delivery of *Lactobacillus brevis*. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 241, 2020.

ADEPU, S.; RAMAKRISHNA, S. Controlled drug delivery systems: current status and future directions. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5905, 2021.

ALOPAEUS, J.F. *et al.* Mucoadhesive buccal films based on a graft co-polymer–A mucin-retentive hydrogel scaffold. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 142, p. 105142, 2020.

ALMEIDA, O. **PATOLOGIA ORAL E MAXILOFACIAL**. Artes Médicas, 168 p., 2016.

ALVES, T. V. G. Obtenção e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida-co-metilcelulose como sistemas carreadores de cloridrato de propranolol. 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What Is Cancer?** Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>. Acesso em: 28 mar. 2023.

ASLANTÜRK, Özlem Sultan. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. **Genotoxicity-A predictable risk to our actual world**, v. 2, p. 64-80, 2018.

BAHRI-NAJAFI, R. *et al.* Preparation and pharmaceutical evaluation of glibenclamide slow release mucoadhesive buccal film. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 9, n. 3, p. 213, 2014.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. 9a ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 2018.

BRASSIL, K.J. **Chemotherapy and immunotherapy guidelines and recommendations for practice**. Oncology Nursing Society, 2019.

BROWN, Philip M.; PRATT, Arthur G.; ISAACS, John D. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 12, p. 731-742, 2016.

CANASSA, Thalita A.; LAMONATO, Anna Luisa; RIBEIRO, Allan Victor. Utilização da lei de Lambert-Beer para determinação da concentração de soluções. **Journal of Experimental Techniques and Instrumentation**, v. 1, n. 2, 2018.

CHAMOLI, Ambika *et al.* Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. **Oral Oncology**, v. 121, p. 105451, 2021.

CHU, Edward; SARTORELLI, A. C. Cancer chemotherapy. **Lange's Basic and Clinical Pharmacology**, p. 948-976, 2018.

CALIXTO, G. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 3719, 2014. APA

COUTINHO, A.J. *et al.* Mucoadhesive and pH responsive fucoidan-chitosan nanoparticles for the oral delivery of methotrexate. **International journal of biological macromolecules**, v. 158, p. 180-188, 2020.

DAHMAH, E. Z.; IYIRE, A.; ALYAMI, H. S. Development of orally dissolving films for pediatric-centric administration of anti-epileptic drug topiramate – A design of experiments (DoE) study. **Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ**, v. 29, n. 7, p. 635, 1 jul. 2021.

DESAI, K.H. *et al.* Development and in vitro-in vivo evaluation of fenretinide-loaded oral mucoadhesive patches for site-specific chemoprevention of oral cancer. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 10, p. 2599-2609, 2011.

DESHPANDE, Amol; NANDU, Vipul V.; JADHAV, Jaideep. Role of Single-Agent Methotrexate as a Neoadjuvant Chemotherapy in Oral Cavity Cancers. **Indian Journal of Surgical Oncology**, v. 10, p. 125-129, 2019.

DE PAZ, D. *et al.* Prognostic stratification of patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma. **Current oncology reports**, v. 19, n. 10, p. 1-9, 2017.

DINTE, Elena *et al.* In Vitro and In Vivo Characterisation of a Mucoadhesive Buccal Film Loaded with Doxycycline Hyclate for Topical Application in Periodontitis. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 580, 2023.

DI PRIMA, Giulia; CAMPISI, Giuseppina; DE CARO, Viviana. Amorphous ropinirole-loaded mucoadhesive buccal film: A potential patient-friendly tool to improve drug pharmacokinetic profile and effectiveness. **Journal of Personalized Medicine**, v. 10, n. 4, p. 242, 2020.

DOS PASSOS BRAGA, S. *et al.* Characterization of edible coatings formulated with chitosan and Mentha essential oils and their use to preserve papaya (*Carica papaya* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 65, p. 102472, 2020.

FERLAY J. *et al.* **Global cancer observatory: cancer today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 28 mar. 2023.

FERLAY, J. *et al.* **Cancer statistics for the year 2020: an overview**. International Journal of Cancer, New York, Apr. 2021. DOI 10.1002/ijc.33588.

FERNANDES, Felipe Pereira *et al.* Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films based on pectin and gellan gum containing triamcinolone acetate. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, 2018.

FORD, S.M. **Farmacologia clínica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

GONÇALVES, S.S. *et al.* Efeito Do Glicerol Nas Propriedades Mecânicas De Filmes A Base De Quitosana. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 6, n. Especial, p. 110-117, 2019.

HALL, John E. **Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica**. Elsevier Health Sciences, 2021.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HENG, P.W.S. Controlled release drug delivery systems. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 9, p. 833-833, 2018.

HOWARD, A.; AGRAWAL, N.; GOOI, Z. Lip and Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 35, n. 5, p. 895-911, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2023.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5 - Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. 2009.

JIN, B. *et al.* Development and in vitro evaluation of mucoadhesive patches of methotrexate for targeted delivery in oral cancer. **Oncology letters**, v. 15, n. 2, p. 2541-2549, 2018.

JOHNSON, D.E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature reviews Disease primers**, v. 6, n. 1, p. 1-22, 2020.

JOVANOVIĆ, M. *et al.* Mucoadhesive gelatin buccal films with propranolol hydrochloride: Evaluation of mechanical, mucoadhesive, and biopharmaceutical properties. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 273, 2021.

KARKI, S. *et al.* Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 11, n. 5, p. 559-574, 2016.

KHODADADEI, Fatemeh; SAFARIAN, Shahrokh; GHANBARI, Narges. Methotrexate-loaded nitrogen-doped graphene quantum dots nanocarriers as an efficient anticancer drug delivery system. **Materials Science and Engineering: C**, v. 79, p. 280-285, 2017.

KOLAND, Marina et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan buccal films of ondansetron hydrochloride. **International journal of pharmaceutical investigation**, v. 1, n. 3, p. 164, 2011.

KUMAR, A. *et al.* Mucoadhesive formulations: Innovations, merits, drawbacks, and future outlook. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 7, p. 797-814, 2020.

KUMRIA, Rachna *et al.* Buccal films of prednisolone with enhanced bioavailability. **Drug delivery**, v. 23, n. 2, p. 471-478, 2016.

LI, Karen Lu; CASTILLO, Agnes Llamasares. **Formulation and evaluation of a mucoadhesive buccal tablet of mefenamic acid**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 56, 2020.

LI, Z. *et al.* Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives. **Oncology reports**, v. 38, n. 2, p. 611-624, 2017.

MEHER, Jaya Gopal *et al.* Development and characterization of cellulose-polymethacrylate mucoadhesive film for buccal delivery of carvedilol. **Carbohydrate polymers**, v. 96, n. 1, p. 172-180, 2013.

MOHAMMADI-SAMANI, S.; BAHRI-NAJAFI, R.; YOUSEFI, G. Formulation and in vitro evaluation of prednisolone buccoadhesive tablets. **Il Farmaco**, v. 60, n. 4, p. 339-344, 2005.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, Sofia *et al.* Poloxamer 407 based-nanoparticles for controlled release of methotrexate. **International journal of pharmaceuticals**, v. 575, p. 118924, 2020.

NAIR, A. B. *et al.* Mucoadhesive buccal film of almotriptan improved therapeutic delivery in rabbit model. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 2, p. 201-209, 1 fev. 2020.

NAIR, A.B. *et al.* Development of mucoadhesive buccal film for rizatriptan: In vitro and in vivo evaluation. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 728, 2021.

NEVILLE, B.W. *et al.* **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 4 ed., 912 p., 2016.

PAI, R. B. et al. Analysis of in vitro and in vivo sensitivity of oral cancer cells to methotrexate. **Experimental Oncology**, 2009.

PAMLÉNYI, Krisztián et al. Development and evaluation of bioadhesive buccal films based on sodium alginate for allergy therapy. **Heliyon**, v. 8, n. 8, p. e10364, 2022.

PATHAK, K. A. et al. In vitro chemosensitivity profile of oral squamous cell cancer and its correlation with clinical response to chemotherapy. **Indian journal of cancer**, v. 44, n. 4, p. 142-146, 2007.

PATHAN, S.A. *et al.* Buccoadhesive drug delivery systems-extensive review on recent patents. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 2, n. 2, p. 177-188, 2008.

PLEGUEZUELOS-VILLA, M. *et al.* A novel lidocaine hydrochloride mucoadhesive films for periodontal diseases. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2019.

PREZOTTI, Fabíola Garavello *et al.* Mucoadhesive films based on gellan gum/pectin blends as potential platform for buccal drug delivery. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 25, n. 2, p. 159-167, 2020.

SALEHI, S.; BODDOHI, S. Design and optimization of kollicoat® IR based mucoadhesive buccal film for co-delivery of rizatriptan benzoate and propranolol hydrochloride. **Materials Science and Engineering: C**, v. 97, p. 230–244, 1 abr. 2019.

SANTOS, J.C.S. *et al.* Avaliação Clínico-epidemiológica de Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas Oral. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 68, n. 1, 2022.

SEMALTY, Mona; SEMALTY, Ajay; KUMAR, Ganesh. Formulation and characterization of mucoadhesive buccal films of glipizide. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 70, n. 1, p. 43, 2008.

SUN, Haina *et al.* Morphology effect of nano-hydroxyapatite as a drug carrier of methotrexate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, p. 1-8, 2017.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, Hoboken, v. 71, n. 3, p. 209-249, Feb. 2021.

TAGHE, Shiva et al. Polymeric inserts containing Eudragit® L100 nanoparticle for improved ocular delivery of azithromycin. **Biomedicines**, v. 8, n. 11, p. 466, 2020.

UZUNOĞLU, Burcum *et al.* Mucoadhesive bilayered buccal platform for antifungal drug delivery into the oral cavity. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, p. 318-327, 2021.

VALER, J.B. *et al.* Oral mucositis in childhood cancer patients receiving high-dose methotrexate: Prevalence, relationship with other toxicities and methotrexate elimination. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 31, n. 2, p. 238-246, 2021.

WONG, T. S. C.; WIESENFELD, D. Oral cancer. **Australian dental journal**, v. 63, p. S91-S99, 2018.

World Health Organization. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 28 mar. 2023.

YOUNG, Kaylie L. *et al.* Conjugating methotrexate to magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles via trichloro-s-triazine. **Journal of materials chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6400-6406, 2009.

YU, Wen-Jun *et al.* Polymeric nanoscale drug carriers mediate the delivery of methotrexate for developing therapeutic interventions against cancer and rheumatoid arthritis. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 1734, 2020.

ZAMAN, Muhammad; HANIF, Muhammad; SHAHERYAR, Zaib Ali. Development of Tizanidine HCl-Meloxicam loaded mucoadhesive buccal films: In-vitro and in-vivo evaluation. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0194410, 2018.