

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia
Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos
para o celecoxibe na quimioprevenção do câncer oral:
influência da azona como promotor de penetração

Yara Peluso Cid

Rio de Janeiro
2009

YARA PELUSO CID

Desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos para o celecoxibe na quimioprevenção do câncer oral: Influência da azona como promotor de penetração.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Maria Bernadete Riemma Pierre
Co-orientadora: Valéria Pereira de Sousa

Rio de Janeiro
2009

C568d

Cid, Yara Peluso.

Desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivas para o celecoxibe na quimioprevenção do câncer oral: influência da azona como promotor de penetração / Yara Peluso Cid; orientador Maria Bernadete Riemma Pierre. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2009.

xviii, 129f. : il. ; 30cm.

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2009.
Inclui bibliografia.

1. Celecoxibe. 2. Sistema de liberação mucoadesivo. 3. Quimioprevenção. I. Pierre, Maria Bernadete Riemma. II. Título.

CDD 615.6

YARA PELUSO CID

Desenvolvimento de sistemas de liberação mucoadesivos para o celecoxibe na quimioprevenção do câncer oral: Influência da azona como promotor de penetração.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Riemma Pierre
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria L.B. Vitória Bentley
Faculdade de Farmácia – USP- Ribeirão Preto

Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi
Faculdade de Odontologia – USP- Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Mônica Freiman S. Ramos
Faculdade de Farmácia – UFRJ

"Se você rouba idéias de um autor, é plágio.
Se você rouba de muitos autores, é pesquisa."
(Wilson Mizner)

"Não há impasse quando se está imbuído de desafio.
Não se anda porque existe um caminho; por andar é que se abre o caminho."
(Daisaku Ikeda)

**Ao grande amor da minha vida,
meu marido Leo, que esteve ao meu
lado em todos os momentos.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família que é o grande alicerce que sustenta tudo. Minha base, meu chão, minha motivação. Muito obrigada por acreditarem em mim, torcer e nunca terem me deixado desistir e ainda incentivar a seguir em frente! Amo muito todos vocês. Meu pai Luquinha, minha mãe Márcia e meus irmãozinhos lindos Ivan e Isabella. Obrigada!

Ao grande amor da minha vida, que um pouco antes do início do mestrado era meu amigo, o então agora meu marido Leo, que acompanhou de perto, desde o começo, todas as conquistas e todas as frustrações, todos os altos e baixos, na alegria e na tristeza. Te Amo. Obrigada por tudo!

As minhas amigas queridas Izabela e Nanda que mesmo de longe continuam sempre ao meu lado. Amo muito vocês.

A minha grande amiga Tai, minha super companheira de laboratório, de projeto e de muitas outras coisas mais. Muito obrigado por toda a força. Sem você não sei o que teria sido de mim. Adoro muito você.

As minhas queridíssimas companheiras de laboratório e de terapia de grupo que viraram amigas para toda a vida Monique e Joyce, que juntamente comigo e Tai formaram as molas do LabCQ.

À amiga Viviane Magalhães, por todo o apoio e momentos de descontração.

À amiga Daniela Decache pelo companheirismo e conselhos de quem já passou por isso.

A todos os amigos do laboratório Adriana, Renata, Vinícius, Raquel, Luis Francisco, Viviane, Yasmin, João, Alice, Juliana, Gisele, Maíra, Isabel, Gleiciane, pela convivência exaustiva nos melhores e piores momentos.

A Eliane por todos os sábios conselhos que eu sempre precisei escutar ao longo desses anos de convivência.

A Maria, por fazer todos os dias se tornarem mais leves logo pela manhã com um sorriso enorme e um maravilhoso “Bom Dia”. Por ser nossa mãezona e nos fazer sentir sempre como se estivéssemos em casa.

A minha co-orientadora Professora Valéria, por todo o apoio e todas as oportunidades concedidas.

Aos Professores Sheila Garcia e Maurício Trambaiolli por todo o apoio e oportunidades concedidas.

Ao Professor Carlos Alberto Manssour Fraga pela orientação crucial em parte do trabalho.

Ao Arthur Kummerle do Lassbio da Faculdade de Farmácia - UFRJ por todo o auxílio na etapa de extração do fármaco.

Ao Professor Vinícius Pedrazzi da Faculdade de Odontologia – USP- Ribeirão-Preto, por todo o apoio concedido para realização dos estudos de mucoadesão e pela participação na banca examinadora.

As Professoras Vitória Bentley e Mônica Freiman pela participação na banca examinadora.

Ao Edson Volta, do Laboratório Integrado de Pesquisa em Biocompatibilidade de Materiais da Faculdade de Odontologia - USP - Ribeirão-Preto pelo auxílio na realização nos ensaios de força de tensão.

A Professora Patrícia Maria Bernardo Maia Campos e ao Flávio Bueno do Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Farmácia – USP – Ribeirão-Preto, pelo auxílio na realização dos estudos de reologia.

A todo o pessoal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia – USP – Ribeirão-Preto pelo apoio e amizade.

Ao Professor Nelson Matos, diretor do Departamento de Produção Animal e ao pessoal da Suinocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela doação de material das bochechas suínas para realização dos ensaios de mucoadesão e permeabilidade.

E finalmente, e em destaque, à minha orientadora Professora Maria Bernadete, por todo o entusiasmo, apoio, motivação e orientação essenciais para a realização de todo esse trabalho. Nunca vou esquecer que fui sua primeira filha acadêmica. Muito Obrigada!

RESUMO

O celecoxibe (CB) é um fármaco da classe dos AINEs inibidores seletivos da enzima ciclooxigenase (COX-2), os quais produzem efeitos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos. Ultimamente vêm sendo utilizado como agente de quimioprevenção, em diversos tipos de câncer. O mecanismo de ação quimiopreventivo está envolvido com a inibição da COX-2, além da influência na apoptose e angiogênese. A alta lipofilicidade do CB pode limitar a sua penetração no epitélio da mucosa bucal, prejudicando assim sua retenção neste local, e conseqüentemente seus efeitos quimiopreventivos no câncer de mucosa oral. Desse modo, para superar esta limitação deve-se promover a penetração do fármaco no tecido. O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento e caracterização de um sistema de liberação tópico para o CB utilizando o quitosano (QT) como polímero mucoadesivo e azona (AZ) como promotor de penetração para utilização no tratamento quimiopreventivo do câncer oral. Também foram avaliadas as propriedades físico-químicas como pH, reologia, mucoadesão, liberação *in vitro* e estudos de permeabilidade *in vitro* utilizando mucosa de bochecha suína. Os resultados mostram que de forma geral, o aumento da concentração do polímero levou a uma formulação com propriedades físico-químicas mais adequadas. As formulações contendo QT a 3% apresentaram pH na faixa de 5,8 estando dentro da faixa do pH bucal (5,5 - 7,4); maiores valores de viscosidade aparente, propriedade de pseudoplasticidade e tixotropia, além de maior força de mucoadesão, que favorecem a retenção da formulação no local de ação. Os estudos de liberação *in vitro* demonstraram que a presença de QT promove um sistema de liberação sustentada do CB. O aumento da concentração de QT assim como de AZ provocaram um aumento da viscosidade e conseqüente diminuição da quantidade de CB liberada a partir das formulações. As formulações contendo 2% e 3% de QT foram as que demonstraram adequada liberação controlada do CB. Os estudos de permeabilidade *in vitro* demonstraram baixa permeação através da mucosa e alta retenção tecidual do fármaco, caracterizando um sistema de liberação tópico com baixa absorção sistêmica. Assim, o aumento da concentração de AZ e QT levaram ao aumento da retenção tecidual sugerindo a promoção de um efeito sinérgico de promoção de penetração do fármaco na mucosa oral a partir dos efeitos do promotor de penetração AZ e do polímero mucoadesivo QT. Os resultados mostraram que as formulações contendo QT 3% na presença de AZ 2% e 3% podem ser utilizadas com sistema de liberação do fármaco CB, proporcionando uma liberação sustentada e adequadas propriedades reológicas, de pH e mucoadesivas. Além disso, o sistema foi caracterizado como tópico podendo ser utilizado no tratamento quimiopreventivo do câncer oral sem causar efeitos adversos oriundos da absorção sistêmica do celecoxibe.

ABSTRACT

Celecoxib (CB) is a non steroidal antiinflammatory drug that belongs to COX-2 selective inhibitors, which produce antiinflammatory, analgesic and antipyretic effects. Lately, it has been explored in chemoprevention of many different types of cancers. The mechanism associated with chemopreventive action of CB is related to COX-2 inhibition, besides of the influence in apoptosis and angiogenesis. One challenge to be considered is the high lipophilicity of CB, which could limit its penetration on buccal epithelium, which is the target for chemoprevention effect in oral cancer. So, to circumvent this limitation, drug penetration in the buccal tissue should be promoted. The aim of the present study was the development and characterization of a topical delivery system for celecoxib using chitosan as mucoadhesive polymer and azone as penetration enhancer for chemoprevention treatment of oral cancer. Also, was evaluated the physical-chemical properties as pH, rheology, mucoadhesion and *in vitro* release and *in vitro* permeability studies using porcine buccal cheek. In general, the results have showed that the increase of polymer concentration led to formulations with physical-chemical properties more appropriate. The formulation containing 3% of Ch have showed pH values in the range of 5.8, next to buccal pH (5.5–7.4); higher values of η_{sp}/c , apparent viscosity, pseudoplastic and thixotropic properties, besides higher mucoadhesion forces witch favors formulation retention on local action. *In vitro* release studies have showed that QT gels promote a sustained delivery system for CB. Increasing of QT concentration as well as the penetration enhancer (AZ) there was an increased in the viscosity and consequently decreased CB release from formulations. The 2% and 3% QT gels were those that have shown more appropriate sustained drug release. *In vitro* permeability studies showed low drug permeation through mucosa and high drug retention in buccal epithelium, characterizing a topical delivery system. The increasing of AZ and QT concentration led to an increase of tissue retention, suggesting a synergistic effect of drug penetration enhancement based on AZ and QT effects. The results has showed that formulations containing QT 3% containing AZ 2% and 3% could be used as delivery system for CB, providing a sustained release and appropriate pH, rheological and mucoadhesive properties. Besides, the system was also characterized as topical wich could be used on chemoprevention treatment for oral cancer without causing adverse effect from systemic absorption of celecoxib.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química do celecoxibe.	21
FIGURA 2 – Observação clínica dos diversos graus do processo do câncer (Instituto Nacional do Câncer, 2002).	24
FIGURA 3 – Via de síntese dos prostanóides a partir do ácido araquidônico e envolvimento com COX-2 no desenvolvimento do câncer (Adaptado de URADE, 2008).	27
FIGURA 4 – Estrutura da mucosa oral (Adaptado de SUDHAKAR <i>et al</i> 2006).	30
FIGURA 5 – Representação esquemática da teoria de adesão difusional - camada superior e inferior (a) antes do contato, (b) logo depois do contato, (c) depois de um período de contato, (d) interpenetração entre as cadeias poliméricas e a camada de muco da mucosa (Adaptado de Huang <i>et al.</i> , 2000).	32
FIGURA 6 – Estrutura química do quitosano com x = grau de acetilação e n = número de unidades de açúcar por polímero (DODANE & VILIVALAM, 1998).	35
FIGURA 7 – Estrutura química da azona (WILLIAMS <i>et al.</i> , 2004)	39
FIGURA 8 – Representação da Célula de Difusão de Franz	42
FIGURA 9 – Reômetro Brookfield- Modelo DV-III	52
FIGURA 10 – Esquema representativo do ensaio de mucoadesão. (a) e (b): preparo da amostra, (c) e (d) Máquina universal de ensaios - M.E.M 2000	54
FIGURA 11 – Representação da célula de difusão vertical modificada (a); compartimento doador (b e c); compartimento doador com membrana (d).	60
FIGURA 12 – Representação da limpeza da mucosa de bochecha suína	62
FIGURA 13 – Espectro de infravermelho do CB obtido experimentalmente	65
FIGURA 14 – Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio do celecoxibe	66
FIGURA 15 - Seletividade do método para quantificação do CB extraído – espectro de varredura (a) padrão) (b) amostra	67
FIGURA 16 – Curva de calibração do padrão para quantificação de CB	67
FIGURA 17 – Reograma das formulações Matrizes de QT 1% (A); 2% (B) E 3% (C) na ausência de CB e AZ.	71
FIGURA 18 – Reograma das formulações Controle de QT 1% (A); 2% (B) E 3% (C) contendo CB 2% (p/p) e na ausência de AZ.	72

FIGURA 19 – Reograma das formulações de QT 2% contendo CB 2% (p/p) e na presença de AZ 1% (A); 2% (B) E 3%.	73
FIGURA 20 – Reograma das formulações de QT 3% contendo CB 2% (p/p) e na presença de AZ 1% (A); 2% (B) E 3%.	74
FIGURA 21 - Medidas de mucoadesão – Força de tensão (mM) das formulações QT 1%; QT 2% e QT 3% contendo AZ 1% (p/p).	76
FIGURA 22 – Cromatogramas de injeção (a) formulação placebo; (b) formulação contendo CB; (c) formulação contendo CB em maiores concentrações.	79
FIGURA 23 – Seletividade do método – (a) gráfico de ratiograms, (b) sobreposição de espectros e (c) espectro de varredura.	80
FIGURA 24 – Curva padrão média do 1º e 2º dia de testes	81
FIGURA 25 - Quantidade de CB liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) das formulações contendo QT 1% (A); 2% (B) e 3% (C) na ausência (Controle QT) e na presença do promotor de penetração AZ 1%, 2% e 3%.	88
FIGURA 26 - Quantidade de CB liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) das formulações contendo QT 1% (A); 2% (B) e 3% (C) na ausência (Controle QT) e na presença do promotor de penetração AZ 1%, 2% e 3%.	89
FIGURA 27 - Quantidade de CB permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) das formulações contendo QT 1% (A); 2% (B) e 3% (C) na ausência (Controle QT) e na presença do promotor de penetração AZ 1%, 2% e 3%.	95
FIGURA 28 – Quantidade de CB retida (μg) após 24 horas de estudo de permeação das formulações de CB 2% (p/p) em QT 1%, 2% e 3% na ausência (Controle) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%)	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição saliva artificial utilizada nos ensaios de Mucoadesão	55
TABELA 2 – Quantificação do CB extraído por Espectrofotometria UV-Vis	68
TABELA 3 – Formulações desenvolvidas	69
TABELA 4 - Determinação de pH das formulações desenvolvidas	70
TABELA 5 - Parâmetros físicos das formulações testadas	75
TABELA 6 - Medidas de mucoadesão – Força de tensão (mN) das formulações QT 1%; 2% e 3% contendo AZ 1% (p/p).	76
TABELA 7 – Teste preliminar escolha solução receptora	77
TABELA 8 – Escolha da concentração de Tween 20	77
TABELA 9 – Análise de linearidade do método	81
TABELA 10 - Repetibilidade e precisão intermediária	82
TABELA 11 - Precisão de injeção	83
TABELA 12 – Exatidão do método	84
TABELA 13 – Valores de limite de quantificação e limite de detecção	85
TABELA 14 - Quantidade CB liberada em cada tempo na SR nos estudos de liberação <i>in vitro</i> das formulações CB (2% p/p) em etanol (controle EtOH) e em QT 1%, 2% e 3% na ausência (Controle) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%)	86
TABELA 15 - Resumo dos dados estatísticos da quantidade de CB acumulado no meio receptor após 24 horas de estudo de liberação <i>in vitro</i> das formulações CB 2% (p/p) em Etanol (Controle EtOH) e em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%). ^a Significativo para $P < 0,05$.	87
TABELA 16 – Determinação do fluxo e cinética de liberação das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).	90
TABELA 17 - Resumo dos dados estatísticos do fluxo de liberação após 24 horas de estudo das formulações CB 2% (p/p) em Etanol (Controle EtOH) e em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%). ^a Significativo para $P < 0,05$.	91
TABELA 18 - Quantidade CB permeado em cada tempo na SR nos estudos de permeação <i>in vitro</i> das formulações CB em QT 1%, 2% e 3% na ausência (Controle) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).	93

TABELA 19 - Resumo dos dados estatísticos da quantidade de CB acumulado no meio receptor após 24 horas de estudo de permeação <i>in vitro</i> das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%). ^a Significativo para P < 0,05.	94
TABELA 20 – Determinação do fluxo e cinética de permeação das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).	96
TABELA 21 - Resumo dos dados estatísticos do fluxo de permeação após 24 horas de estudo de permeação <i>in vitro</i> das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%). ^a Significativo para P < 0,05.	97
TABELA 22 - Quantidade CB retido ($\mu\text{g} \pm \text{DP}$) após 24 horas de estudo de permeação das formulações de CB 2% (p/p) em QT 1%, 2% e 3% na ausência (Controle) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).	98
TABELA 23 - Resumo dos dados estatísticos da quantidade de CB retido nas mucosas após 24 horas de estudo de permeação <i>in vitro</i> das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%). ^a Significativo para P < 0,05.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE – Antiinflamatório não esteroideal

AZ - Azona

CB – Celecoxibe

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COX - Araquidonato Ciclooxygenase

DP - Desvio Padrão

DPR - Desvio Padrão Relativo

EtOH - Etanol

FU – Farmácia Universitária

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

PGE₂ – Prostaglandina E₂

QT – Quitosano

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SE - Solução Estoque

SM – Solução Mãe

SR – Solução Receptora

UV – Ultravioleta

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	19
1.1 - ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAI	19
1.2 - O CÂNCER DA MUCOSA ORAL	22
1.3 - A QUIMIOPREVENÇÃO	25
1.4 - A MUCOSA BUCAL	29
1.5 – SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MUCOADESIVOS	31
1.5.1 - O uso de géis de quitosano como sistema de liberação de fármacos	34
1.6 – PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA MUCOSA ORAL	36
1.6.1 - Promotores de penetração	37
1.7 – ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	40
1.8 – ESTUDOS E PERMEAÇÃO E RETENÇÃO <i>IN VITRO</i>	41
2- OBJETIVOS	43
2.1- OBJETIVOS GERAIS	43
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3- MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 – Material	44
3.1.1 - Equipamentos e acessórios	44
3.1.2 - Reagentes e Materiais de Referência	45
3.1.3 – Produtos farmacêuticos	46
3.1.4 – Material Biológico	47
3.2 – MÉTODOS	47
3.2.1 – Obtenção do fármaco celecoxibe	47
3.2.1.1 – Extração por solvente em soxhlet	47
3.2.1.2 - Purificação do fármaco por recristalização	47
3.2.2 – Caracterização do fármaco celecoxibe	48
3.2.2.1 - Faixa de fusão	48
3.2.2.2 – Espectrometria no infravermelho	48

3.2.2.3 – Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)	48
3.2.3 – Quantificação do fármaco Celecoxibe	49
3.2.3.1 – Condições de análise	49
3.2.3.2 – Preparo da solução estoque (SE) de CB	49
3.2.3.3 – Preparo da curva padrão	50
3.2.3.4 – Preparo da solução amostra	50
3.2.5 – Obtenção das formulações	50
3.2.6 – Caracterização físico-química das formulações	51
3.2.6.1 – Determinação de pH	51
3.2.6.2 – Comportamento reológico das formulações	51
3.2.6.3 – Estudo das propriedades mucoadesivas: força de tensão	52
3.2.7 – Estudo de solubilidade e escolha da solução receptora	55
3.2.8 – Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação do CB nos ensaios de liberação e permeação <i>in vitro</i>	56
3.2.8.1 - Condições cromatográficas	57
3.2.8.2 – Preparo da solução mãe (SM) de CB	57
3.2.8.3 – Preparo da solução estoque (SE) de CB	57
3.2.8.4 – Preparo da curva padrão	58
3.2.8.5 – Preparo da solução amostra	58
3.2.8.6 - Validação do método	58
3.2.9 – Estudos de liberação <i>in vitro</i>	59
3.2.9.1 - Preparo da solução receptora	59
3.2.9.2 - Montagem da célula de difusão modificada	59
3.2.9.3 – Condições da análise	60
3.2.9.4 – Estudo de cinética e análise do fluxo de liberação <i>in vitro</i>	61
3.2.10 - Estudos de permeabilidade <i>in vitro</i> utilizando mucosa bucal de porco	61
3.2.10.1 – Preparo da membrana natural	61

3.2.10.2 – Estudos de permeação <i>in vitro</i>	62
3.2.10.3 – Estudo de cinética e análise do fluxo de permeação <i>in vitro</i>	62
3.2.10.4 – Estudos de retenção	63
4- RESULTADOS	64
4.1 – CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO CELECOXIBE	64
4.1.1 - Determinação da massa obtida após extração e recristalização	64
4.1.2 - Determinação do ponto de fusão	64
4.1.3 - Espectrometria de infravermelho	64
4.1.4 - Ressonância magnética nuclear	65
4.2 – QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO CELECOXIBE	66
4.3 – OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES	68
4.4 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES	69
4.4.1 – Determinação de pH das formulações	69
4.4.2 – Comportamento reológico das formulações	70
4.4.3 – Estudo das propriedades de mucoadesão – força de tensão	75
4.5 – SOLUBILIDADE E ESCOLHA DA SOLUÇÃO RECEPTORA	77
4.6 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DO CB NOS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i>	78
4.6.1 – Desenvolvimento da metodologia analítica	78
4.6.2 – Validação da metodologia analítica	78
4.6.2.1 – Seletividade	78
4.6.2.2 – Linearidade	81
4.6.2.3 - Repetibilidade e precisão intermediária	82
4.6.2.4 – Precisão de injeção	83
4.6.2.5 – Exatidão	83
4.6.2.6 - Limite de quantificação e detecção	84
4.7 - ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	85
4.7.1 – Perfil de liberação	90

4.7.2 – Estudo de cinética e análise do fluxo de liberação <i>in vitro</i>	92
4.8 - ESTUDOS DE PERMEABILIDADE <i>IN VITRO</i> USANDO MUCOSA BUCAL DE PORCO	92
4.8.1 – Estudo de permeação <i>in vitro</i>	92
4.8.2 - Estudo de cinética e análise do fluxo de permeação <i>in vitro</i>	96
4.8.3 – Estudos de retenção	97
5 – DISCUSSÃO	100
6- CONCLUSÕES	121
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) constituem um grupo heterogêneo de compostos que apresentam efeitos terapêuticos similares para o tratamento da dor, inflamação e febre. Seus principais efeitos são antiinflamatório, analgésico e antipirético (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Os AINEs são fármacos cujo mecanismo de ação envolve a inibição da enzima ciclooxigenase (COX), a enzima-chave para a síntese dos prostanóides e tromboxanos. Os prostanóides são mediadores lipídicos que coordenam uma enorme variedade de processos fisiológicos e patológicos através de receptores de membrana localizados na superfície das células alvo (FITZPATRICK & SOBERMAN, 2001). Estas substâncias têm importante função homeostática na proteção da mucosa gástrica, fisiologia renal, gestação e agregação plaquetária, além de terem sua produção induzida em condições como inflamação e câncer (ARAÚJO *et al.*, 2005). Através da inibição da COX, os AINEs produzem efeitos antiinflamatórios (modificação da reação inflamatória), analgésicos (redução de certos tipos de dor) e antipiréticos (redução da elevação da temperatura) (HANG *et al.*, 1999). Além disso, compartilham numa maior ou menor extensão, de alguns efeitos adversos como ulcerações, sangramentos, perfurações e obstruções gastrintestinais (ARAÚJO *et al.*, 2005). Sabe-se que existem duas isoformas da enzima ciclooxigenase: COX-1 e COX-2. A primeira é uma enzima constitutiva, expressa na maioria dos tecidos do organismo, agindo na produção de prostaglandinas que controlam os processos fisiológicos normais. A COX-2 não está presente na maioria dos tecidos normais e tem sua concentração aumentada principalmente nos processos inflamatórios (MÉRIC *et al.*, 2006).

Os primeiros AINES desenvolvidos foram os clássicos AINEs não-específicos (indometacina, naproxeno, ibuprofeno, entre outros), que inibem tanto uma como a outra isoforma da COX e, apesar de terem eficácia comprovada quanto ao efeito antiinflamatório a

que se propõem, têm uso contínuo limitado devido a efeitos adversos gastrintestinais como dor abdominal, além de perfuração ou sangramento gastroduodenal em menor proporção (VENTURA *et al.*, 2005). Esses efeitos adversos apresentados são oriundos da inibição da isoforma COX-1. Desse modo, tornou-se necessário o desenvolvimento de uma subclasse de AINEs, os inibidores específicos de COX-2, com a intenção de diminuir a inflamação com a mesma eficácia, sem provocar os efeitos gastrintestinais oriundos da inibição da COX-1. Entre esses novos AINEs podemos incluir o lumiracoxibe, valdecoxibe, etoricoxibe e celecoxibe (ARAÚJO *et al.*, 2005).

Apesar dos AINEs de 2ª geração atuarem através da inibição seletiva da isoforma 2 da COX, seu uso contínuo está associado ao aumento dos riscos de acidentes cardiovasculares. Porém, estudos mais recentes evidenciam o potencial desta classe em provocar efeitos adversos cardiovasculares apenas em indivíduos predispostos (ARAÚJO *et al.*, 2005).

Mais recentemente sua ação na carcinogênese tem se tornado mais evidente, parecendo influenciar na apoptose e angiogênese. (MÉRIC *et al.*, 2006). Além disso, estudos recentes comprovam que também exercem um efeito antimutagênico direto em condições de estresse oxidativo (MATHIAS *et al.* 2006). Há evidências cada vez maiores que indicam o papel da COX-2 e seus produtos, notadamente a prostaglandina E2 (PGE2), no desenvolvimento de vários tipos de câncer. A super expressão da COX-2 tem sido evidenciada em vários neoplasmas incluindo câncer de cólon, estômago, esôfago, fígado, pâncreas, língua, mamas, pele e oral (KISMET *et al.*, 2004). Isto significa que a enzima COX-2 pode ser uma molécula alvo na terapia anticâncer direcionando para a chave do processo carcinogênico (MÉRIC *et al.*, 2006).

Os AINES COX-2-seletivos vêm sendo utilizados como agentes de quimioprevenção (KISMET *et al.*, 2004) os quais têm reduzido significativamente o risco, o número, o tamanho ou a propagação de alguns cânceres (AHNEN *et al.*, 1998). Porém, dados preliminares têm sugerido que estes fármacos também exibem efeitos preventivos em várias outras doenças

de impacto em saúde pública (SAWAKOA *et al.*, 1998b; MERIC *et al.*, 2006). O mecanismo pelo qual os AINES exercem seus efeitos preventivos ainda não está completamente elucidado, mas parecem estar relacionados, pelo menos em parte, à supressão da enzima COX-2. Estudos clínicos e análises histoquímicas de amostras de tecidos coletados de pacientes mostraram que a enzima COX-2 foi extensivamente expressada no câncer oral (CHAN *et al.*, 1999; AKITA *et al.*, 2004). A expressão da COX-2 foi detectada em lesões displásicas da mucosa oral humana (MAGNE *et al.*, 2002), sendo também evidenciado que a indução e a atividade da enzima COX-2 ocorre em consequência das mudanças durante o desenvolvimento da carcinogênese (OSHIMA *et al.*, 1996). Enquanto a eficiência da quimioprevenção sistêmica no câncer oral tem sido bem demonstrada, infelizmente, seu uso tem sido prejudicado pelos seus efeitos colaterais tóxicos, especialmente naqueles indivíduos que estão sob tratamento prolongado ou que adoeceram em consequência de câncer secundário (PAPADIMITRA & HONG, 1997). A toxicidade também limita o uso de uma dose adequada e por um período de tempo suficiente para o resultado desejado. Por essa razão, a quimioprevenção através da administração local de AINEs específicos para a enzima COX-2 representa uma estratégia mais adequada.

O celecoxibe (CB), (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]benzenesulfonamida) é um fármaco antiinflamatório não esteroide, capaz de inibir seletivamente a COX-2. A Figura 1 mostra a estrutura química do celecoxibe.

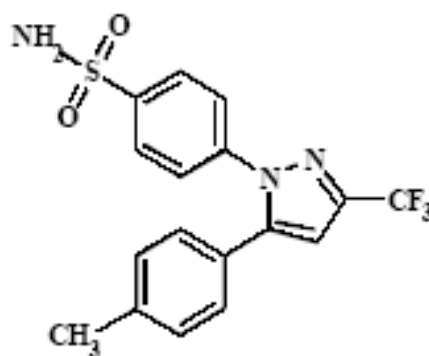


FIGURA 1 - Estrutura química do celecoxibe

O celecoxibe já existe no mercado (nome comercial: Celebra[®]), na forma de cápsulas orais de 100 e 200 mg sendo indicado para o tratamento sintomático da osteoartrite e artrite reumatóide; tratamento da dor aguda; e alívio dos sintomas de dismenorréia primária.

Recentemente o CB tem sido explorado na quimioprevenção de vários tipos de câncer: ovariano (BARNES *et al.*, 2005), mamas (HARRIS R.E. *et al.*, 2006), cólon (REDDY *et al.*, 2000) além de carcinoma gástrico, câncer de pâncreas, de bexiga, de pele (KISMET *et al.*, 2004) e oral (NISHIMURA *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2002).

A administração tópica do CB (WILGUS *et al.*, 2003) tem mostrado potencial uso terapêutico na prevenção do câncer de pele induzido por radiação UVB, ou seja, houve um efeito quimiopreventivo em estudos com animais pela inibição da formação de um novo tumor, retardando a latência tumoral. Desse modo, estes estudos demonstraram que o celecoxibe pode ser utilizado como um potencial agente quimiopreventivo em diferentes tipos de cânceres. O mecanismo de quimioprevenção do CB ainda não é claro, mas é muito provável que seja multifatorial, com a inibição da COX-2, indução de apoptose e regulação da angiogênese (KISMET *et al.*, 2004).

1.2 O CÂNCER DA MUCOSA ORAL

O câncer é um processo no qual uma seqüência de alterações genéticas transforma gradualmente uma célula normal em cancerosa (KISMET *et al.*, 2004). O câncer da mucosa oral é tipicamente o resultado de um processo lento e acumulativo que a superfície do epitélio sofre após exposição repetida por carcinógenos como, por exemplo, o tabaco. Assim deve-se incentivar a prevenção para inibir ou reverter a carcinogênese antes que se torne uma doença invasiva (WANG *et al.*, 2003). O câncer de mucosa bucal é um neoplasma agressivo, sendo mais freqüente em homens e associado a hábitos como o tabagismo e alcoolismo (SIECZKA *et al.*, 2001). Estudos em fase inicial revelam a expressão diferenciada

de vários genes em fumantes, sendo que esses genes podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de carcinogênese na cavidade oral (SMITH *et al.*, 2006). Apesar dos avanços em radioterapia, quimioterapia e cirurgia, a sobrevivência de pacientes com câncer oral não tem tido aumento significativo. Além disso, muitos pacientes que obtiveram cura de câncer primário desenvolveram lesões secundárias.

Vários estudos apóiam o conceito de que o desenvolvimento de vários tipos de câncer, nos seres humanos, está associado à exposição a fatores cancerígenos, principalmente os ambientais. Os agentes físicos, químicos e biológicos lesam o DNA, produzindo mutações, fraturas cromossômicas e outras alterações do material genético. O mecanismo de desenvolvimento do câncer é descrito em três fases: iniciação, promoção e progressão. A iniciação envolve a exposição a um carcinógeno e a sua interação com o DNA celular, que lhe provoca uma alteração permanente. Esta célula alterada permanece latente, podendo ser eliminada do organismo pelos mecanismos homeostáticos ou vir a desenvolver outras alterações, na dependência de novos estímulos. A fase de promoção ocorre quando as células iniciadoras, após a lesão inicial são submetidas à exposição aos chamados agentes promotores, apresentando os efeitos carcinogênicos. Como estes agentes não são mutagênicos, seus efeitos podem ser reversíveis numa fase inicial e somente uma exposição prolongada poderia induzir efetivamente o processo de carcinogênese. Já a fase de progressão consiste no processo pelo qual são ultrapassados os mecanismos que regulam a replicação celular, assim como sua organização espacial, estabelecendo-se o fenótipo maligno.

Em termos gerais, a evolução da célula normal para a tumoral é caracterizada por alterações na composição dos cromossomas, que podem resultar na ativação dos oncogenes ou na inativação dos genes de supressão tumoral. As alterações celulares que resultam da exposição da mucosa bucal aos agentes cancerígenos, inicialmente se manifestam por lesões inflamatórias inespecíficas. Se esta agressão é intensa e prolongada, levará ao desenvolvimento das displasias. Estas podem evoluir desde um grau leve até um

grau intenso e, finalmente, para o carcinoma *in situ*. A displasia leve corresponde às alterações celulares que se restringem à camada basal e, normalmente, não se associa a figuras de mitose. Na moderada, temos modificações que atingem o terço médio do epitélio, enquanto que na displasia acentuada as alterações podem alcançar o terço superior. A partir da ruptura da membrana basal, temos então o carcinoma micro e macro invasor, que infiltra, respectivamente, em menor ou maior grau, o tecido conjuntivo vascularizado.

A Figura 2 representa o processo do câncer da mucosa oral em vários graus. Pode-se notar que é possível distinguir clinicamente os estágios da doença. Sendo assim torna-se fácil o diagnóstico nos estágios iniciais da doença, possibilitando a implementação do tratamento quimiopreventivo, antes que o processo se torne invasivo.

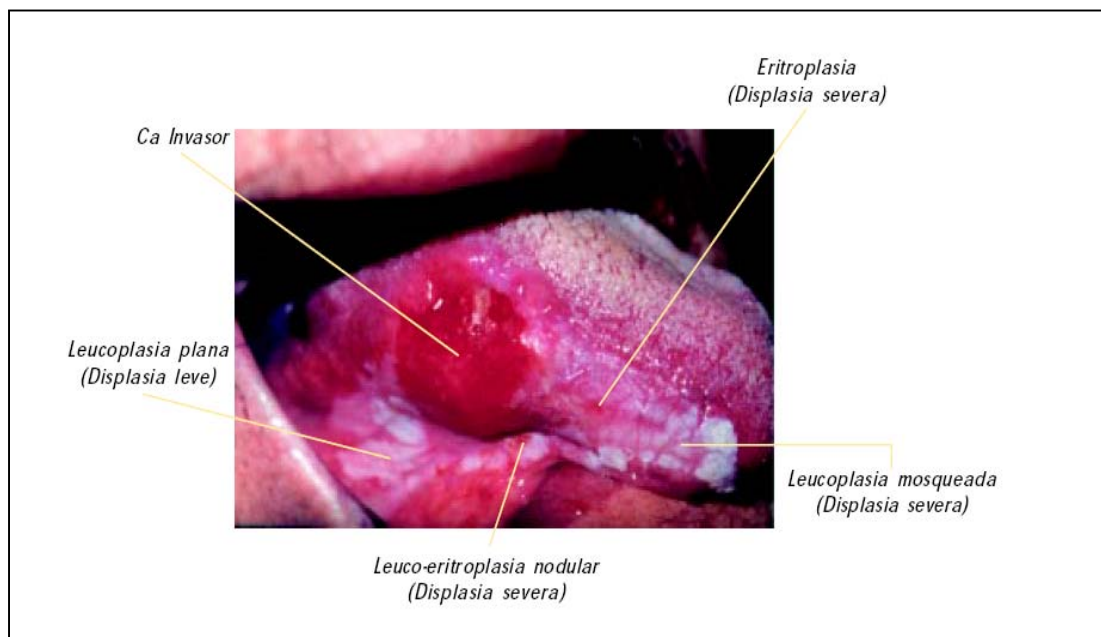


FIGURA 2 - Observação clínica dos diversos graus do processo do câncer de mucosa oral (Instituto Nacional de Câncer, 2002).

1.3 A QUIMIOPREVENÇÃO

Além da terapia do câncer, a prevenção se tornou uma ferramenta importante no controle da doença. Dentre algumas estratégias de prevenção estão a diminuição da exposição a agentes carcinogênicos, mudanças no estilo de vida pessoal, promoção de mecanismos de defesa celular e a quimioprevenção (HAIL *et al.*, 2008). A quimioprevenção se refere ao uso de fármacos ou substâncias naturais para prevenir lesões pré-cancerosas, interromper ou reverter o câncer invasivo ou para suprimir o processo de carcinogênese. Conseqüentemente, um agente quimiopreventivo eficaz deve intervir nos estágios iniciais pré-cancerígenos para eliminar células pré-malignas ou proteger as células de transformações. Os agentes de quimioprevenção devem apresentar baixa toxicidade e fácil administração, considerando o estado de saúde relativamente bom dos pacientes submetidos a este tipo de tratamento (BARNES *et al.*, 2005). A quimioprevenção é uma estratégia promissora na inibição de carcinoma, antes do desenvolvimento de tumores invasivos, mas estratégias correntes estão longe de estarem satisfatórias, especialmente por causa da toxicidade significativa dos agentes quimioterápicos envolvidos (WANG *et al.*, 2002). Os agentes que agem na quimioprevenção do câncer bloqueiam a transformação de células normais e suprimem a promoção de células pré-malignas e malignas. Acredita-se que o mecanismo de ação, no qual esses agentes quimiopreventivos promovem a supressão da promoção e progressão de células pré-malignas está envolvido com a modulação da proliferação celular e/ou diferenciação, como é o caso, por exemplo, dos inibidores seletivos COX-2 (HAIL *et al.*, 2008).

O câncer oral representa o primeiro tumor sólido no qual se estabeleceu uma estratégia de prevenção aplicável. Seu desenvolvimento se dá em diversos passos a partir de vários estímulos carcinogênicos na mucosa oral. As lesões se iniciam geralmente em condições pré-malignas e são facilmente diagnosticadas clinicamente. Devido a algumas razões tornou-se um modelo ideal para investigação de estratégias quimiopreventivas. A

primeira delas é o conhecimento dos fatores etiológicos como tabaco, álcool e infecções por vírus. Além disso, a identificação de lesões pré-malignas (leucoplasia, eritroplasia e fibrose submucosa); a definição de um modelo de progressão tumoral distinguindo displasia leve, moderada e severa e a possibilidade de execução de exames de biópsia repetidos e imediatos contribuem para a sua eleição como modelo (VERONESI *et al.*, 2005).

Diversos agentes terapêuticos já foram estudados na quimioprevenção do câncer oral, incluindo retinóides, beta-caroteno, vitamina E, selênio e inibidores COX-2 (KURIAKOSE & SHARAN, 2006). A descoberta de duas isoformas da COX (COX-1 constitutiva e COX-2 induzida) permitiu uma nova oportunidade na aplicação dos AINEs. Altos níveis de COX-2 ocorrem no processo inflamatório e estão diretamente associados com a progressão do câncer e angiogênese do tumor, já que estão altamente expressos em diversos tipos de câncer. A Figura 3 mostra a via de síntese dos protanoides a partir do ácido araquidônico que é liberado da membrana fosfolipídica pela fosfolipase A2. COX-1 e COX-2 convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas (PGG₂) seguida da conversão de PGH₂ em outras isoformas de PG e tromboxanos (TXA₂). Dentre eles a PGE₂ é o prostanóide principal e exibe diversas atividades biológicas via receptores PGE₂. Isso sugere que os inibidores específicos da COX-2 podem ser poderosos agentes quimiopreventivos. Muitas evidências suportam a hipótese de que a COX-2 tem um papel crucial na carcinogênese. O nível de prostaglandina produzido por tumores malignos é maior do que os encontrados em tecidos normais, provavelmente devido ao aumento da expressão da COX-2 nesses tecidos. Acredita-se que a prostaglandina exerce um papel importante na patogenicidade do câncer devido aos seus efeitos na proliferação celular, angiogênese e apoptose. Esta hipótese é suportada por resultados epidemiológicos e experimentais de que inibidores da COX, incluindo AINEs, protegem contra uma variedade de tumores (CHUM & SURH, 2004).

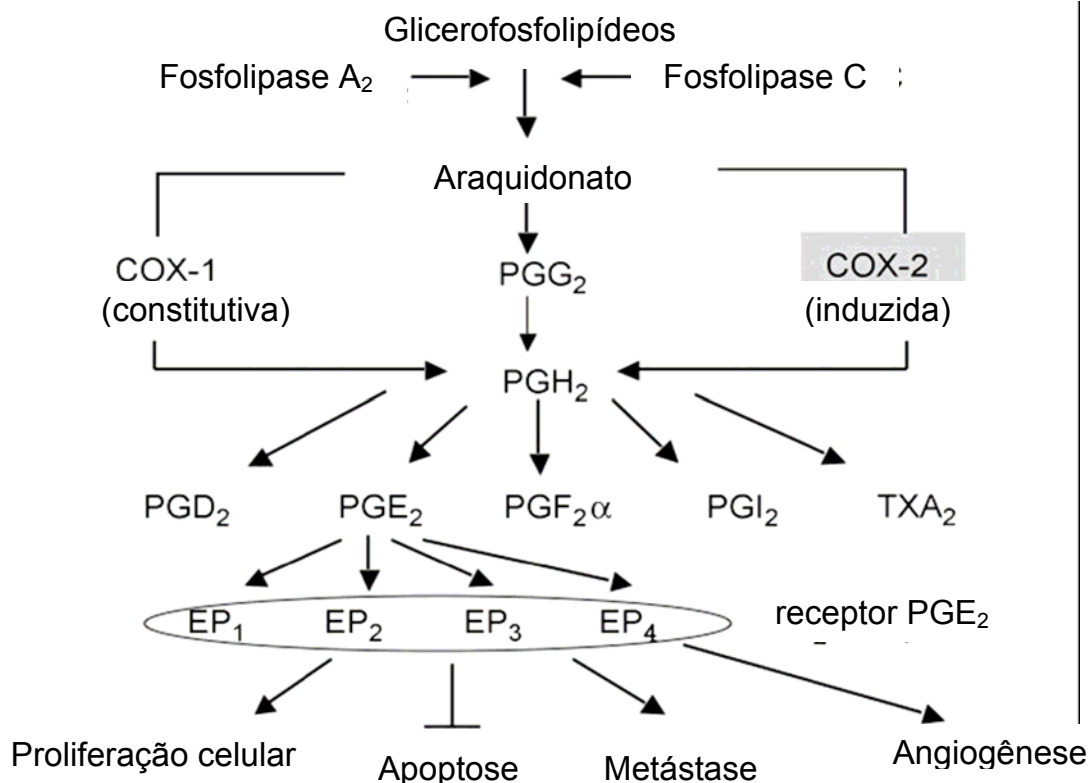


FIGURA 3 - Via de síntese dos prostanoídeos a partir do ácido araquidônico e envolvimento com a COX-2 no desenvolvimento do câncer.

O CB já demonstrou sua ação quimiopreventiva em estudos pré-clínicos contra diversos tipos de câncer (CROWELLI *et al.*, 2005) e a partir do resultado desses estudos foi aprovado pelo FDA como fármaco de escolha para o tratamento de polipose adenomatosa familiar. Baseado na eficácia dos estudos pré-clínicos, o celecoxibe foi utilizado em estudos *in vivo* na prevenção de alguns tipos de câncer (CROWELLI *et al.*, 2005). Esses estudos demonstraram o efeito do celecoxibe na quimioprevenção do câncer garantindo seu futuro uso como agente quimiopreventivo (LIPPMAN, 2008).

KISMET *et al.* (2004) sugerem que o efeito quimiopreventivo dos AINEs está relacionado com outros mecanismos de ação, além da inibição da COX que resulta na diminuição da produção de prostaglandinas. Um deles é a indução de apoptose, que já foi evidenciada em estudos com diversos tipos de câncer como cólon (SHENG *et al.*, 1998) estômago (SAWAKOA *et al.*, 1998a; SAWAKOA *et al.*, 1998b) próstata (LIU *et al.*, 1998) e leucemia mielóide crônica (SUBHASHIMI *et al.*, 2005). Esses autores concluíram que, apesar

de seu mecanismo de quimioprevenção não estar completamente elucidado, o celecoxibe pode ser considerado um potente agente quimiopreventivo em diferentes tipos de câncer com menor toxicidade e efeitos colaterais em relação com outros AINEs. WANG e colaboradores (2003) demonstraram que a aplicação tópica do CB exerceu efeito inibitório significativo em células de carcinoma oral, indicando uma nova estratégia no tratamento preventivo do câncer oral nos estágios iniciais da doença.

No intuito de elucidar a penetração local de antiinflamatórios não esteroidais utilizados na quimioprevenção do câncer oral através da liberação tópica, SOOD e colaboradores (2005) realizaram um estudo de permeabilidade tópica com esses fármacos. Os resultados elegeram o celecoxibe como fármaco de escolha devido às suas propriedades físico-químicas e bioquímicas mais adequadas para a aplicação tópica. Baseado nesses resultados o mesmo grupo desenvolveu um estudo de quimioprevenção utilizando o celecoxibe aplicado topicamente em modelo animal. O fármaco demonstrou redução na incidência de carcinoma e seu efeito na prevenção do câncer foi associado à inibição da síntese de prostaglandina (LI *et al.*, 2005).

Em resumo, estas observações implicam que a enzima COX-2 pode ser um excelente alvo para o tratamento de lesões orais pré-malignas e apoiam a razão para o uso do CB como fármaco potencial para a quimioprevenção do câncer oral. Sendo um AINE seletivo para COX-2, se aplicado diretamente no local de ação desejado, o CB poderia constituir uma inovação terapêutica para a quimioprevenção do câncer oral, reduzindo o risco de efeitos colaterais sistêmicos, enquanto preserva a eficácia do tratamento.

1.4 A MUCOSA BUCAL

A mucosa bucal apresenta uma extensa área de tecido liso, imóvel, expansível e com espessura razoável (500 a 800 μm), possuindo uma área ideal para aplicação de sistemas de liberação prolongada. Em comparação com a pele, a mucosa bucal é de 4 a 4000 vezes mais permeável (SOOD *et al.*, 2005), porém é menos permeável que a mucosa sublingual, facilitando o controle da absorção sistêmica (PEDRAZZI, 1999). Por outro lado, quando comparada com o trato gastrointestinal, possui melhor acessibilidade e menor atividade enzimática. Finalmente, apresenta ainda vantagens em relação à tolerância a potenciais agentes sensibilizadores em comparação com a mucosa nasal e a pele (JUNGINGER *et al.*, 1999).

A mucosa bucal é composta por diversas camadas de diferentes tipos celulares (Figura 4). Divide-se basicamente em tecido conectivo, lâmina basal, epitélio e muco. O epitélio é similar ao epitélio estratificado escamoso encontrado no resto do corpo humano, porém não queratinizado. A função do epitélio é proteger o tecido contra a perda de fluido, contra antígenos, substâncias carcinogênicas, toxinas microbianas e até mesmo da ação de enzima proveniente da ingestão de alimentos e bebidas (HARRIS D. *et al.*, 1992). O tecido conectivo é composto de lamina própria o qual é irrigado com veias e capilares venosos que chegam à veia jugular interna, e submucosa, que fica logo acima da camada epitelial. O muco é uma secreção espessa composta por sais inorgânicos suspensos em água e da glico-proteína mucina, que cobre as células epiteliais da mucosa bucal. A parte densa do açúcar presente na molécula da mucina proporciona capacidade de ligação com água e também resistência à proteólise, o que pode ser importante para manutenção da propriedade de barreira da mucosa. (SUDHAKAR *et al.*, 2006).

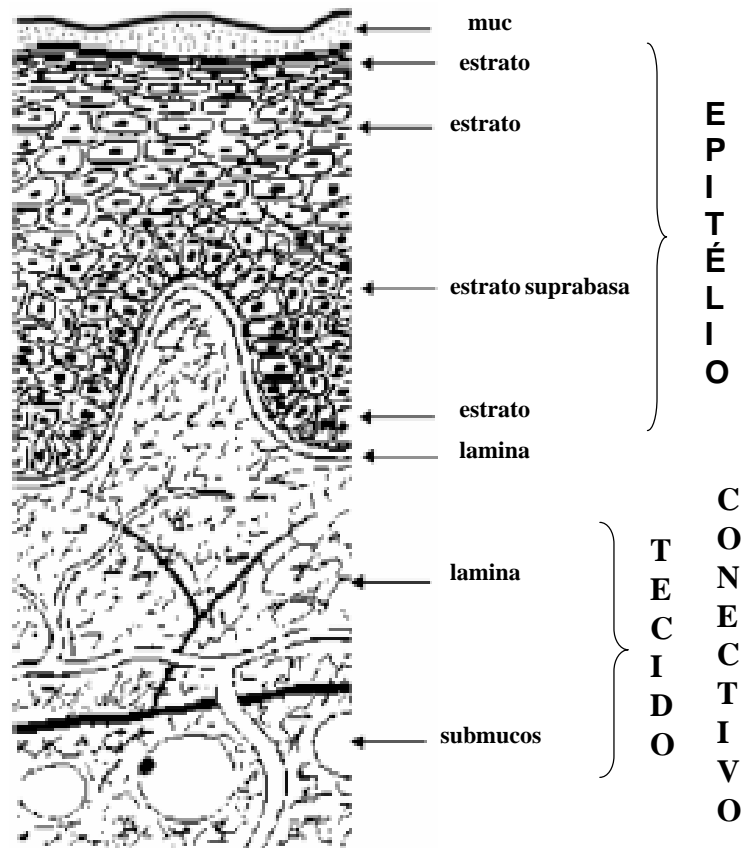


FIGURA 4 – Estrutura da mucosa oral (Adaptado de SUDHAKAR *et al.*, 2006).

O muco é um excelente lubrificante, mas também tem função protetora. Possui propriedades de aderência, espalhando-se como uma película fina sobre a superfície bucal. Em pH bucal, o muco pode formar uma estrutura de gel fortemente coesiva que se liga com a superfície do epitélio como uma camada gelatinosa. O muco, portanto, permite o movimento relativo entre as células, exercendo um importante papel na adesão de sistemas de liberação mucoadesivos (PEDRAZZI, 1999).

A saliva é secretada pelas glândulas salivares e cobre, juntamente com a mucina, a superfície da mucosa oral. As funções da saliva são, entre outras, a manutenção da hidratação, lubrificação e atividade antimicrobiana. Assim, a saliva e a mucina salivar

parecem contribuir para as propriedades de barreira da mucosa oral (SUDHAKAR *et al.*, 2006). O fluido oral pode ser considerado um fluido protetor de todos tecidos desta cavidade, pois age como tampão, mantendo o pH na faixa de 5,75 a 7,05 e é composto basicamente de água (99,5%), compostos orgânicos (0,3%) e compostos inorgânicos (0,2%) (SCHOLZ *et al.*, 2008). A contínua secreção de saliva pelas glândulas salivares (0,5 - 2,0 L/dia) leva a diluição subsequente do fármaco, podendo levar a perda de fármaco dissolvido ou em suspensão e finalmente a remoção da formulação aplicada na cavidade bucal, constituindo uma desvantagem em relação à retenção do medicamento no local aplicado (MILLER *et al.*, 2005).

1.5 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MUCOADESIVOS

Geralmente, a saliva e as atividades mecânicas removem rapidamente o medicamento aplicado sobre a superfície da mucosa bucal, dificultando a retenção da formulação na superfície do tecido alvo por tempo e concentração adequadas. As formas de liberação bucal convencionais possuem algumas limitações como diluição contínua da dose pelo fluxo salivar com conseqüente diminuição na biodisponibilidade para absorção, além de não permitirem comer, beber ou falar.

Uma forma de liberação ideal deve permanecer na boca por algumas horas e liberar o fármaco de forma controlada e unidirecional (LÓPEZ *et al.*, 1998). A fim de preencher os requerimentos terapêuticos, as formulações para liberação bucal devem possuir algumas características como: boa mucoadesão, alta resistência contra mecanismos de remoção fisiológica, proporcionar contato prolongado da formulação com a mucosa e possuir propriedades de liberação prolongada (SANDRI *et al.* 2004). Desse modo, substâncias ou sistemas de liberação mucoadesivos para a mucosa bucal são necessários para administração de fármacos por esta via (LOPEZ *et al* 1998).

A liberação de fármacos a partir de sistemas bioadesivos em tecidos mucosos envolve três diferentes camadas: o próprio sistema bioadesivo, a camada mucosa e a camada celular do epitélio. Ocorre uma mútua interpenetração entre as camadas envolvidas, favorecendo um aumento da área de contato entre elas e estabelecendo ligações físicas entre o sistema bioadesivo e o substrato biológico (PEDRAZZI 1999).

A mucoadesão envolve a ligação de um polímero natural ou sintético a um substrato biológico, ou seja, aumenta a intimidade e a duração do contato entre o veículo contendo o fármaco e a superfície da mucosa (HUANG *et al.*, 2000). É um método prático de imobilização ou localização e um aspecto novo e importante em sistemas de liberação. Um sistema de liberação mucoadesivo pode melhorar a eficácia do tratamento, mantendo a concentração do fármaco no nível terapêutico, inibindo a diluição do fármaco em fluidos biológicos, e permitindo o direcionamento do fármaco para locais específicos.

A força de biodesão é a força interfacial que mantém unidos o material adesivo e tecido biológico. Os métodos para mensurar a mucoadesão de sistemas de liberação mucoadesivos são importantes no desenvolvimento destas formulações para estudar a compatibilidade, estabilidade e força de ligação bioadesiva. Estes métodos podem ser qualitativos ou quantitativos (SUDHAKAR *et al.*, 2006).

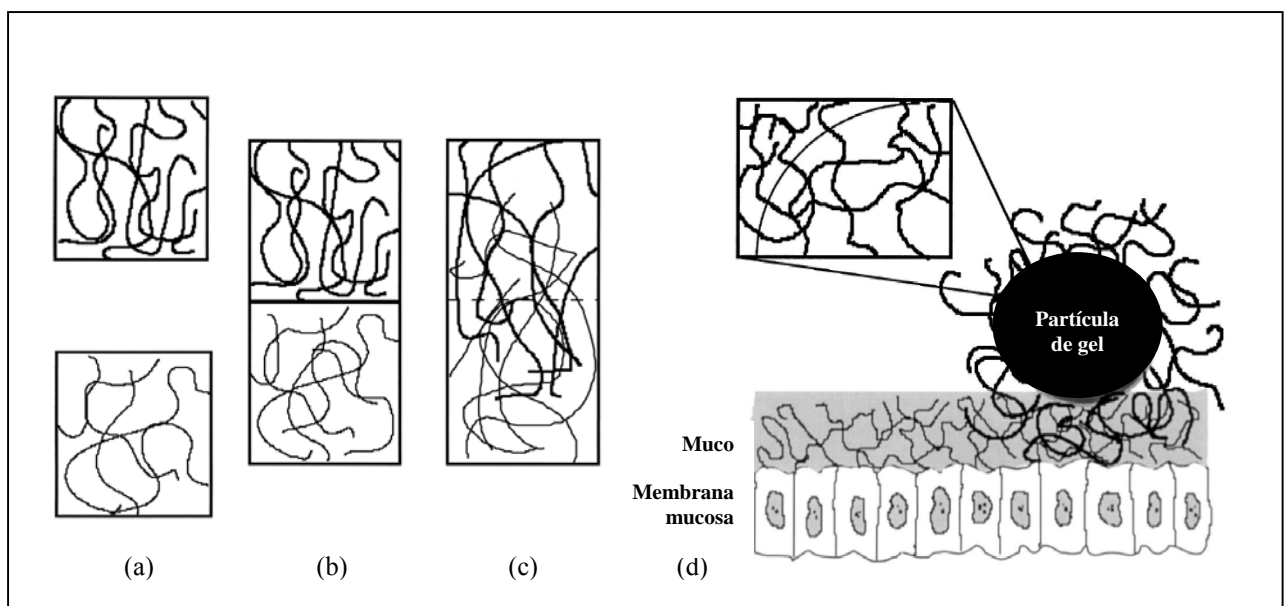


FIGURA 5 – Representação esquemática da teoria de adesão difusional - camada superior e inferior (a) antes do contato, (b) logo depois do contato, (c) depois de um período de contato, (d) interpenetração entre as cadeias poliméricas e a camada de muco da mucosa (Adaptado de HUANG *et al.*, 2000).

As formulações bioadesivas utilizam como componente adesivo os polímeros, os quais formam líquidos viscosos quando hidratados, aumentam o tempo de retenção sobre a superfície da mucosa e proporcionam interações adesivas. Os polímeros bioadesivos devem possuir algumas propriedades físico-químicas incluindo hidrofiliicidade, grupos formadores de ligação de hidrogênio, flexibilidade para interpenetração no muco e tecido epitelial e propriedades viscoelásticas. Além disso, não devem ser tóxicos, nem irritantes, ter boa espalhabilidade, serem biodegradáveis e biocompatíveis e aderir rapidamente à mucosa bucal (SUDHAKAR *et al.*, 2006).

Estudos de revisão relatam o uso de algumas classes de polímeros bioadesivos: hidrogéis, copolímeros, polímeros multifuncionais e polímeros tiolados. Os hidrogéis são matrizes hidrofílicas que absorvem água quando submetidas a meio aquoso e liberam as moléculas do fármaco através de espaços ou canais que se formam com o relaxamento da cadeia. Alguns exemplos de polímeros que formam hidrogéis incluem poliacrilatos, polioxietilenos, algumas gomas naturais como goma xantana e goma guar, celulose e derivados. Os copolímeros são formados por dois ou mais monômeros diferentes, resultando numa cadeia com diversas propriedades. Alguns copolímeros são formados por monômeros hidrofóbicos e hidrofílicos que são chamados de polímeros micelares, sendo que esses são capazes de incluir moléculas individualmente. Os polímeros tiolados são uma classe especial de polímeros multifuncionais chamados de tiômeros, os quais são macromoléculas hidrofílicas que exibem um grupo tiol livre na cadeia polimérica e são capazes de formar pontes dissulfeto com resíduos de cisteína presentes nas glicoproteínas que cobrem a membrana mucosa. Estes polímeros são representados por derivados do ácido poliacrílico e derivados do quitosano. Existem também os polímeros multifuncionais, que possuem outras propriedades além da bioadesão, como inibição enzimática e efeito de

promotor de permeação. Alguns exemplos são poliacrilatos, policarbofil e o quitosano (SUDHAKAR *et al.*, 2006).

O primeiro estudo utilizando polímero na forma de filme como veículo para a liberação do celecoxibe para inibição de células do carcinoma oral humano foi descrito por WANG *et al.*, 2003. Neste estudo, camundongos sem pêlo foram inoculados intradermicamente com as células de carcinoma e posteriormente os animais foram tratados com o filme polimérico desenvolvido. Os resultados indicaram que a aplicação da formulação no local de ação desejado produziu efeito inibitório significativo sobre as células do carcinoma oral, pelo menos quando o tratamento foi conduzido nos estágios iniciais da doença. Desse modo, os resultados deste trabalho indicaram que o tratamento local com formulações poliméricas do celecoxibe pode prevenir ou tratar o câncer oral nos estágios iniciais.

1.5.1 O uso de géis de quitosano como sistema de liberação mucoadesivo de fármacos

Os novos sistemas capazes de modificar a liberação de fármacos liberando-os na quantidade adequada num determinado local de absorção possuem algumas vantagens sobre os sistemas de liberação convencionais, como por exemplo, a redução de efeitos colaterais e a frequência de administração; além do direcionamento do fármaco para o local de ação específico. No caso da via bucal, a biodisponibilidade de fármacos têm sido melhorada com o uso de formas farmacêuticas bioadesivas, pois estas prolongam o tempo de residência do fármaco no local de ação, além de alcançar uma liberação sustentada.

O quitosano (QT) (Figura 6) é um copolímero linear composto por unidades de 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glucopirranose e 2-amino-2-deoxi- β -D-glicopirranose ligadas por ligações β (1-4) (THANOU *et al.*, 2001). Pode ser produzido por deacetilação alcalina da quitina, um polissacarídeo facilmente encontrado na natureza, proveniente de crustáceos,

insetos e alguns fungos. É, portanto, de fácil obtenção e barato. O QT não é tão facilmente definido em termos de composição química exata, portanto refere-se geralmente a uma família de polímeros que são caracterizadas em relação ao número de unidades de açúcar por molécula polimérica, o que define o peso molecular, e pelo grau de deacetilação. Embora o grau de deacetilação afete a solubilidade do quitosano em soluções aquosas, o polímero é solúvel em soluções ácidas, e fracamente solúvel em soluções básicas fracas (DODANE & VILIVALAM, 1998).

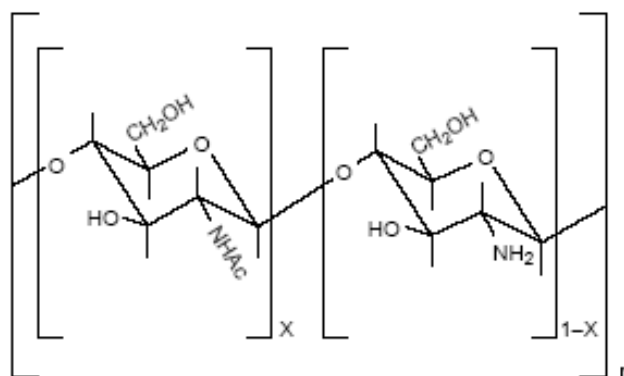


FIGURA 6 - Estrutura química do quitosano com x = grau de acetilação e n = número de unidades de açúcar por polímero (DODANE & VILIVALAM, 1998).

Por possuir diversas propriedades, o QT tem ampla aplicação em várias áreas de atuação, como na agricultura, indústria e medicina. Além disso, vários estudos realizados nos últimos anos comprovam que o quitosano possui várias aplicações no campo farmacêutico. Dentre suas propriedades que interessam a esta área, estão a mucoadesividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade ($LD_{50} = 16$ g/Kg) (DODANE & VILIVALAM, 1998) e alta resistência contra mecanismos de remoção fisiológica (SANDRI *et al.*, 2004). Seus usos não se limitam à via de administração, já que existem estudos relatando o seu uso em diversas vias tais como oral, parenteral, nasal e ocular (DODANE & VILIVALAM, 1998). Devido as suas propriedades, o quitosano tem sido muito utilizado nessa área, principalmente como sistemas de liberação de fármacos, pois promove

uma liberação sustentada, além de atuar como agente de mucoadesão (LOPEZ *et al.*, 1998; EROGLU *et al.*, 2002; OBARA *et al.*, 2005) bem como promotor de penetração, principalmente seus derivados (SCHIPPER *et al.*, 1999; THANOU *et al.*, 2001; SANDRI *et al.*, 2004; LANGOTH *et al.*, 2005). O quitosano tem se mostrado eficaz como promotor de permeação em sistemas mucoadesivos para aplicação na cavidade oral de fármacos lipofílicos e hidrofílicos como demonstrado por LOPEZ *et al.*, 1998. Outros estudos relatam o uso de quitosano como mucoadesivo em formulações para o tratamento de câncer de bexiga (EROGLU *et al.*, 2002), câncer de mama e cólon (JAUHARI *et al.*, 2006).

Em sistemas de liberação de fármacos, o quitosano apresenta vários usos promissores em diferentes formas como disco bucal (LANGOTH *et al.*, 2005) soluções (SCHIPPER *et al.*, 1999; SANDRI *et al.*, 2004; OBARA *et al.*, 2005;) filme polimérico (HAUPT *et al.*, 2006) comprimidos (LOPEZ *et al.*, 1998) e géis (AKSUNGUR *et al.*, 2004). Dentre os estudos recentes que utilizam o quitosano como sistemas de liberação mucoadesivo restrito ao tratamento de patologias que acometem a mucosa bucal, podemos destacar: disco bucal para o tratamento de diabetes tipo 2 (LANGOTH *et al.*, 2005), gel e filme contendo nistatina para o tratamento de micose oral (AKSUNGUR *et al.*, 2004) e solução polimérica contendo aciclovir para o tratamento de patologias virais (SANDRI *et al.*, 2004).

1.6 PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA MUCOSA ORAL

A principal função do epitélio bucal é de proteção do tecido subjacente. Por ser uma região não queratinizada, com permeabilidade de barreira baseada em lipídios, a camada epitelial protege os tecidos subjacentes de perda de fluidos e entrada de antígenos, carcinógenos, toxinas microbiológicas e enzimas de alimentos. O potencial de absorção pela mucosa bucal é influenciado pela solubilidade lipídica e peso molecular do difusante, além do pH e sua influência na ionização das moléculas. As espécies não ionizadas penetram mais facilmente através da mucosa oral comparadas com as espécies ionizadas.

O fluxo de permeação através da mucosa oral varia de acordo com as características físico-químicas da molécula. O processo de difusão através da mucosa oral pode ser por difusão passiva, mediado por carreadores ou por endocitose. A difusão passiva pode ocorrer por duas rotas: transcelular (através das células) ou paracelular (entre as células), sendo esta última de maior importância (SUDHAKAR *et al.*, 2006). Os espaços intercelulares do epitélio da mucosa constituem a maior barreira à penetração de substâncias altamente lipofílicas ou hidrofílicas, dificultando sua permeação no/através do epitélio bucal. Desse modo, a permeação pelas membranas é um fator limitante no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos bioadesivos, pois o epitélio que circunda a mucosa bucal é uma barreira muito eficaz contra absorção de fármacos. Assim a penetração do fármaco dependerá do seu coeficiente de partição nesta membrana, bem como de sua característica de lipofilicidade ou hidrofilicidade (coeficiente de partição óleo/água).

Em consequência da sua estrutura química, o CB mostra características apolares sendo, portanto um fármaco lipofílico (VENTURA *et al.*, 2005) e de alta permeabilidade, pertencendo à classe biofarmacêutica II (SUBRAMANIAN *et al.*, 2004). Apresenta características de um ácido fraco com valores de pKa igual a 11,1, portanto, encontra-se na forma não ionizada em pH fisiológico. A alta lipofilicidade do CB (Log P = 4,21) (SOOD *et al.*, 2005) pode limitar a sua penetração no epitélio da mucosa bucal, prejudicando assim sua retenção neste local, seu alvo para exercer efeito quimiopreventivo no câncer de mucosa oral. Desse modo, para superar esta limitação deve-se promover a penetração e retenção do fármaco na mucosa oral.

1.6.1 Promotores de penetração

As substâncias que facilitam a penetração de fármacos na/através da mucosa bucal são chamadas promotores de penetração. Estes promotores podem ser representados por várias classes de substâncias como agentes quelantes (EDTA), ácido cítrico e salicilato de

sódio; tensoativos (lauril sulfato de sódio e cloreto de benzalcônio); sais biliares; ácidos graxos; complexos de inclusão (ciclodextrinas) e polímeros tiolados. Estas substâncias agem sob diversos mecanismos de ação como mudança na reologia do muco; aumento da fluidez da bicamada lipídica ou aumento da atividade termodinâmica dos fármacos (SUDHAKAR *et al.*, 2006). A maioria dos agentes que aumentam a permeabilidade da pele, também aumenta a permeabilidade da mucosa oral. Os promotores de permeação utilizados para pele como tensoativos, sais biliares e ácidos graxos demonstraram aumento da permeabilidade da mucosa oral em experimentos *in vitro* e *in vivo* (NICOLAZZO *et al.*, 2004). Já que o epitélio bucal é semelhante em estrutura a outros epitélios estratificados do corpo, os promotores utilizados para melhorar a permeação de fármacos em outras mucosas absorptivas têm sido utilizados também para melhorar a penetração bucal de fármacos.

A azona (AZ) ou laurocapram (Figura 7) é um derivado etoxilado do tensoativo não iônico Span 20 (LOPEZ *et al.*, 2000). Sua longa cadeia alquílica parece estar envolvida no mecanismo de promoção da permeação através da sua inserção em regiões de cadeia alquílica dos lipídeos e seu grupo lactama (mais polar) provavelmente interagindo com regiões mais polares dos lipídeos (QUINTANAR *et al.*, 1997). Como se espera de sua estrutura química, a AZ apresenta alta lipofilicidade com Log P em torno de 6,2 e solubilidade compatível com a maioria dos solventes orgânicos incluindo etanol e propilenoglicol. Possui baixa irritabilidade, toxicidade muito baixa ($LD_{50} = 9 \text{ g/Kg}$) e pouca atividade farmacológica (WILLIAMS *et al.*, 2004). Já existe no mercado com nome comercial Azone[®] e foi desenvolvida especificamente para promoção de permeação na pele, no entanto, tem sido estudado como promotor de permeação de fármacos na mucosa oral (NICOLAZZO *et al.*, 2004). Outros estudos revelam que a AZ incorporada na formulação, bem como utilizada como pré-tratamento aumenta a retenção tecidual de fármacos lipofílicos na mucosa bucal (NICOLAZZO *et al.*, 2005b).

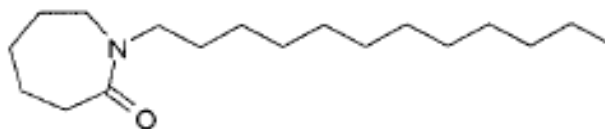


FIGURA 7 - Estrutura química da azona (WILLIAMS *et al.* 2004).

A AZ é eficiente em baixas concentrações aumentando o transporte de vários fármacos como antivirais, antibióticos e esteróides (WILLIAMS *et al.*, 2004). O mecanismo de ação da azona na promoção de permeação através da mucosa oral ainda não está muito claro. Sabe-se que na pele, este mecanismo está envolvido com a ruptura da estrutura lipídica na região intercelular do estrato córneo resultando na promoção da difusão do fármaco. Porém, a estrutura lipídica da mucosa oral humana (não queratinizada) encontra-se num estado menos organizado que o estrato córneo; então é improvável que a AZ possa afetar a ordenação lipídica e a difusividade de fármacos através da mucosa oral. Nestes casos, a promoção da permeação está provavelmente ligada ao aumento da partição do fármaco para o tecido alvo (NICOLAZZO *et al.*, 2004).

A AZ possui as qualidades desejáveis para um bom promotor de penetração, aumentando o transporte de vários fármacos. Em estudo recente, envolvendo fármacos hidrofílicos (cafeína) de lipofilicidade intermediária (triancinolona acetonida) e lipofílico (estradiol) utilizando o pré-tratamento da mucosa oral de bochecha de porco com AZ, NICOLAZZO e colaboradores (2005a) demonstraram que para fármacos hidrofílicos, não houve interferência no fluxo de permeação; para fármacos de lipofilicidade intermediária, houve aumento do fluxo de permeação, no entanto relacionado com o aumento da partição do fármaco para o tecido; e para fármacos lipofílicos, ocorreu a redução do fluxo associado ao aumento da retenção tecidual do fármaco, sugerindo que a AZ aumenta a capacidade reservatória da mucosa bucal. Em outro estudo, NICOLAZZO e colaboradores (2005b) confirmaram a capacidade da AZ em aumentar a retenção tecidual de fármacos lipofílicos

(estradiol) na mucosa bucal, sugerindo sua utilização na terapia local como promotor de permeação de fármacos.

1.7 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

No delineamento de formas farmacêuticas de liberação controlada, o estudo de liberação *in vitro* se torna uma ferramenta importante, pois permite a caracterização do sistema de liberação a partir da determinação da sua cinética de liberação. Para estudar a absorção bucal deve-se primeiramente considerar como as moléculas penetram nas membranas inertes artificiais para que posteriormente possa-se fazer uma avaliação do seu transporte pela mucosa. Os estudos de liberação *in vitro* visam a avaliação da liberação/cedência do fármaco a partir da formulação desenvolvida. No caso das formulações semi-sólidas, esses estudos têm sido extensivamente investigados utilizando células de difusão vertical de Franz com membrana sintética. Entre as membranas sintéticas utilizadas pode-se citar acetato de celulose, borracha ou silicone e ainda sistemas lamelares projetados para mimetizar os lipídeos intercelulares da membrana (ALTON, 2005).

Até o momento nenhum aparato, procedimento ou requerimento para testes de liberação *in vitro* de formulações semi-sólidas estão descritos em farmacopéias relevantes. No entanto, as diretrizes do FDA descrevem procedimentos e requerimentos para estudos de liberação *in vitro* utilizando células de difusão vertical de Franz. Devido à importância da determinação do fluxo de liberação a partir de formulações semi-sólidas, é extremamente desejável desenvolver métodos compendiais para esta determinação. Esses métodos não se resumiriam a um único aparato na farmacopéia para desenvolvimento, caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade de todas as formulações semi-sólidas, devido à variedade de formulações, locais de aplicação e fluxo de liberação da formulação (SIEWET *et al.*, 2004).

1.8 ESTUDOS E PERMEAÇÃO E RETENÇÃO *IN VITRO*

Os estudos de permeação e retenção em membranas naturais permitem prever o comportamento do fármaco através da membrana avaliando sua capacidade de transpô-la, além de avaliar a influência dos componentes da preparação farmacêutica na retenção do fármaco na mucosa (ALTON, 2005).

Para a realização dos estudos de permeabilidade de fármacos (permeação e retenção) alguns modelos são utilizados com vários tipos de células de difusão as quais foram desenvolvidas para o estudo de permeação e retenção, incluindo células de fluxo contínuo e mais comumente as células de Franz (SUDHAKAR *et al.*, 2006). Estas células de difusão (Figura 8) consistem em dois compartimentos separados por uma membrana natural, dispostos verticalmente. O compartimento superior contém a solução doadora que é mantida a concentração e agitação constante e libera o penetrante pela membrana para o compartimento inferior. Este contém a solução receptora em condição *sink*, ou seja, deve ser capaz de assegurar a solubilidade do fármaco, além de mimetizar a condição fisiológica (pH e temperatura). O compartimento inferior ainda possui uma saída lateral por onde alíquotas da solução receptora são coletadas em intervalos de tempo pré-determinados para a determinação do conteúdo do fármaco permeado. A manutenção da temperatura a 37°C é importante para regular o fluxo de permeação e deve ser mantida constante durante todo o experimento através de sistemas de banho de água circulante (TANOJO *et al.*, 1996).

Para os estudos de permeabilidade da mucosa oral, a membrana natural mais utilizada é a mucosa bucal de bochecha de porco (SCHIPPER *et al.*, 1999; NICOLAZZO *et al.*, 2004; SANDRI *et al.*, 2004) devido à similaridade com o epitélio bucal humano em parâmetros importantes como permeabilidade, composição da barreira lipídica, organização histológica e ultraestrutural (LANGOTH *et al.*, 2005).

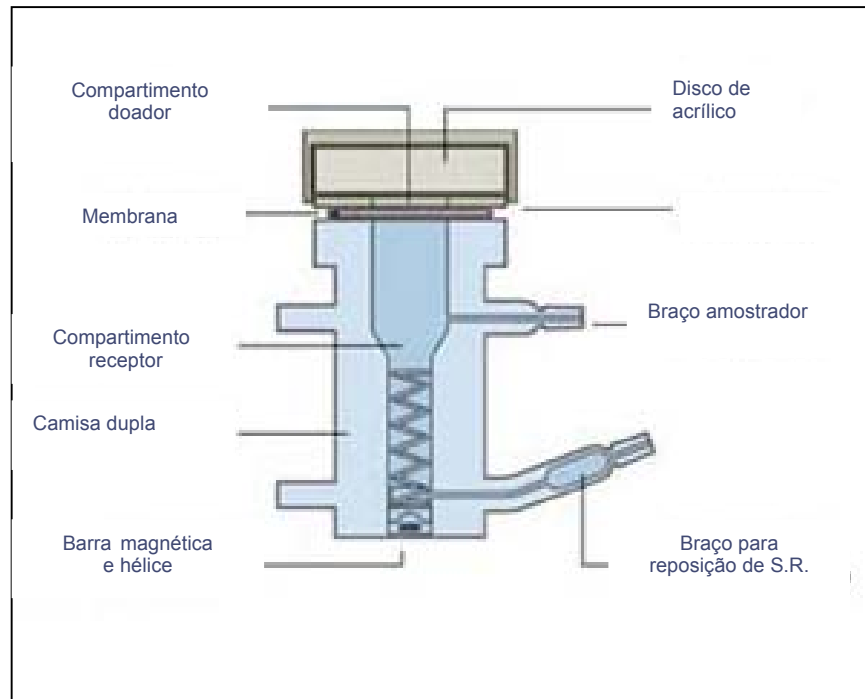


FIGURA 8 - Representação da Célula de Difusão vertical de Franz

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente estudo é desenvolver um sistema de liberação para o fármaco celecoxibe utilizando um polímero mucoadesivo (quitosano) e promotor de penetração (Azona) para explorar a possibilidade do seu uso na terapia do câncer de mucosa oral. O sistema de mucoadesão visa prolongar o tempo de interação do fármaco com o local de aplicação e conseqüentemente proporcionar uma alta retenção deste com mínima absorção sistêmica otimizando assim o efeito local. A presença da azona visa à superação da barreira da mucosa oral, já que o celecoxibe é altamente lipofílico, e como conseqüência possa aumentar a sua disponibilidade no local de ação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção do fármaco celecoxibe a partir de comprimidos comerciais.
- Desenvolvimento de metodologia analítica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência por detecção no UV para quantificação do fármaco celecoxibe.
- Obtenção das formulações.
- Caracterização físico-química das formulações: pH, reologia e propriedades mucoadesivas.
- Estudos de liberação *in vitro*.
- Estudos de permeabilidade *in vitro* usando mucosa bucal de porco.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos ENDOLAB;
- Agitador magnético MAG- MULTI MARTE;
- Balança analítica METTLER TOLEDO – AG204;
- Balança de precisão METTLER TOLEDO – PB3002;
- Balão de fundo redondo RONI – ALZI;
- Bomba a vácuo;
- Banho de ultra-som UNIQUE –USC 2850;
- Células de difusão vertical modificada;
- Centrífuga IEC (International Equipment Company) – CENTRA MP4R;
- Coluna Shim-pack CLC – C8 (5µm) 250 x 4 mm;
- Condensador PYREX;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU – bomba modelo LC-20AT, auto-injetor modelo SIL-20A, detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M20A e sistema de dados (software) modelo LC- Solution Multi versão 1.22;
- Dessecador;
- Destilador QUIMIS;
- Eletrodo DME CV1 em KCl 3M DIGIMED;
- Eletrodo tipo escoamento c/ dupla junção DME-CV4 DIGIMED;

- Espectrofotômetro de infravermelho ABB FTLA 2000-1000;
- Espectrofotômetro de RMN ;
- Espectrofotômetro SHIMADZU UV – 2401 PC;
- Máquina universal de ensaios - M.E.M 2000;
- Manta de aquecimento QUIMIS;
- Membrana filtrante 0,45µm MILLIPORE;
- Membrana FH (fluoropore) em PTFE, hidrofóbica, MILLIPORE;
- Pérolas de vidro;
- Placa aquecedora com agitação CORNING;
- Ponto de fusão BUCHI B-540;
- Potenciômetro DIGIMED – DM21;
- Reômetro Brookfield - DV-III;
- Rotavapor QUIMIS Q-218-1;
- Seringas descartáveis de 5 mL;
- Soxhlet RONI – ALZI;
- Tubo Falcon;
- Ultra-turrax IKA® T25;
- Unidade descartável filtrante 0,45 µm de poro MILLIPORE.

3.1.2 Reagentes e Materiais de Referência

- Acetonitrila P.A. (VETEC);

- Acetonitrila para CLAE (TEDIA);
- Ácido láctico (TEDIA);
- Azona (NetQem);
- Celecoxib – EXIM-PHARM INTERNATIONAL, teor 99,4% (Índia);
- Celecoxib – padrão de trabalho, teor 96,62%;
- Etanol P.A. (VETEC);
- Fosfato de sódio dibásico P.A. heptahidratado (VETEC);
- Fosfato de sódio monobásico P.A. monohidratado (VETEC);
- Fosfato de potássio monobásico P.A. (PROQUÍMIOS);
- Hidróxido de sódio P.A.(PROQUÍMIOS);
- Lauril Sulfato de Sódio (VETEC);
- Quitosano (SIGMA);
- Saliva artificial (FU - UFRJ);
- Tween 20 (MERCK);
- Tween 80 P.S. (VETEC);

3.1.3 Produtos farmacêuticos

- Celebra[®] - Cápsulas de celecoxib 200 mg, adquiridos no mercado nacional, fabricados pela Pfizer, acondicionados em blister com 10 cápsulas, lote BE0002, com data de fabricação de maio de 2006, e data de validade em abril de 2009.

3.1.4 Material Biológico

- Mucosa de bochecha suína

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção do fármaco celecoxibe

3.2.1.1 Extração por solvente em soxhlet

O fármaco foi extraído a partir das cápsulas de CB utilizando o método de extração por solvente em soxhlet. O conteúdo das cápsulas foi transferido para um soxhlet e a extração procedeu-se com 300 mL de água contida em balão de fundo redondo, por cerca de 2 horas. Posteriormente, o extrato aquoso foi retirado e descartado e procedeu-se então a segunda etapa da extração utilizando 300 mL de etanol contido em balão de fundo redondo por cerca de 4 horas e meia. O extrato etanólico foi levado para rotaevaporação por cerca de 2 horas ou até completa evaporação do solvente. O balão então foi deixado em dessecador até peso constante para a secagem completa do material. O procedimento de extração foi realizado cinco vezes, com alíquotas de cerca de 30 cápsulas cada, totalizando 170 cápsulas de Celebra[®] equivalente a 34,0 g de celecoxibe.

3.2.1.2 Purificação do fármaco por recristalização

Após extração por solvente em soxhlet, o fármaco CB foi purificado através de recristalização com solvente. Aqueceu-se concomitantemente cerca de 40 mL de etanol e 40 mL de água destilada até ebulição em placa de aquecimento. Adicionou-se etanol ainda quente a cerca de 2,0 g de CB contidos em béquer sob agitação e aquecimento até

completa solubilização do fármaco. Adicionou-se água até o aparecimento de turvação, deixando esfriar até precipitação do fármaco. O precipitado formado foi filtrado e posteriormente seco em dessecador até peso constante.

3.2.2 Caracterização do fármaco celecoxibe

3.2.2.1 Faixa de fusão

As amostras em triplicata foram introduzidas em capilares de vidro e levadas ao equipamento para determinação da faixa de fusão pelo método do capilar (Farmacopéia Brasileira, 1988).

3.2.2.2 Espectrometria no infravermelho

Foram preparadas pastilhas de KBr contendo 3% (p/p) de CB, as quais foram levadas ao espectrofotômetro de infravermelho, realizando-se varredura do espectro entre 400 e 4000 cm^{-1} . As bandas observadas foram caracterizadas de acordo com os grupos funcionais que a representam.

3.2.2.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

O equipamento foi calibrado utilizando-se referência externa. Em seguida as amostras de CB foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado e levadas ao espectrômetro de RMN, realizando-se análise para a medida de carbono e hidrogênio, com aplicação de frequência de 100 e 400 MHz respectivamente.

3.2.3 Quantificação do fármaco celecoxibe

A determinação do teor de CB após extração e recristalização foi realizado através do método por espectrofotometria de absorção no Ultravioleta (UV) descrito por Saha e colaboradores (2002).

3.2.3.1 Condições de análise

- Comprimento de onda = 251nm
- Diluente = acetonitrila: tampão fosfato de sódio pH 5,6 (50: 50)
- Tampão fosfato = fosfato de sódio dibásico heptahidratado 0,1M: fosfato de sódio monobásico monohidratado 0,1M (94,8: 5,2).

3.2.3.2 Preparo da solução estoque (SE) de CB

Foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 20,0 mg de CB padrão de trabalho com teor 99,4% (lote:CXB-02/07-08) e transferidos para um balão de 200 mL, cujo volume foi completado com diluente, resultando em solução com concentração de 100 µg/mL.

3.2.3.3 Preparo da curva padrão

A partir da SE de 100 µg/mL, descrita no item acima, foram preparadas diluições de 1:100; 5:100; 1:10; 15:100; 2:10 com diluente, obtendo-se soluções com concentrações de CB de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 µg/mL.

3.2.3.4 Preparo da solução amostra

Uma quantidade equivalente a 20,0 mg de CB, extraído das cápsulas de Celebra[®], foi pesada analiticamente e transferida para um balão de 200 mL. Adicionou-se 150 mL de diluente e homogeneizou-se por 10 min no ultra-som. O volume foi completado com diluente, resultando numa concentração de 100 µg/mL. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com diluente e obteve-se uma solução de concentração de 10 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata.

3.2.5 Obtenção das formulações

Primeiramente, o gel foi obtido pela dispersão de quantidades suficientes de quitosano em solução de ácido láctico 1% de modo a obter concentrações de 1%, 2% e 3% (p/p) do polímero no gel. O celecoxibe foi incorporado nas formulações na concentração de 2 % (p/p) utilizando etanol (em quantidade suficiente) como agente solubilizante. O promotor de penetração azona foi incorporado nas formulações nas concentrações de 1%, 2% e 3% (p/p).

3.2.6 Caracterização físico-química das formulações

3.2.6.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado a partir da leitura direta em potenciômetro com eletrodo tipo escoamento c/ dupla junção DME-CV4, específico para semi-sólidos.

3.2.6.2 Comportamento reológico das formulações

Para este estudo, os parâmetros físicos de índice de fluxo, índice de consistência, viscosidade aparente e tixotropia foram avaliados. Foi utilizado um reômetro Brookfield (Figura 9), modelo DV-III, que é um viscosímetro de rotação tipo cone e placa utilizando como dispositivo de medição um cilindro e um spindle (#CP52) para determinação das propriedades reológicas. A amostra é colocada no cilindro e o spindle interno rotatório começa a girar sob uma velocidade angular crescente (1 rpm até 20 rpm) desorganizando o sistema, e depois segue a uma velocidade angular decrescente, reorganizando o sistema. Todas as leituras foram efetuadas em temperatura ambiente, portanto, o ensaio procedeu-se sem avaliação da influência da temperatura.

As medidas e os cálculos necessários para a obtenção dos parâmetros: índice de fluxo, índice de consistência, viscosidade aparente e tixotropia foram realizadas pelo programa Rheocalc V1.01, assim como os reogramas e convertidos em arquivo OPJ pelo programa Microcal Origin 7.5.



FIGURA 9 - Reômetro Brookfield- Modelo DV-III

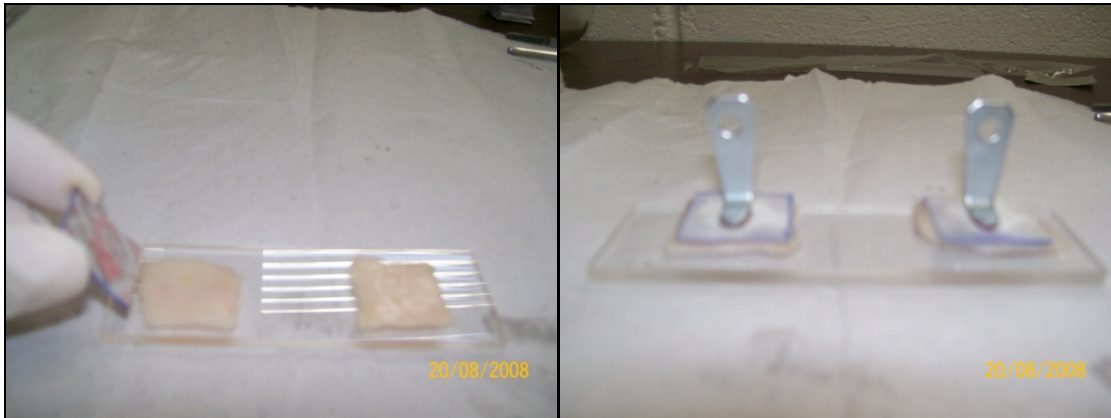
3.2.6.3 Estudo das propriedades mucoadesivas: força de tensão

O estudo das propriedades mucoadesivas das formulações foi realizado pelo método quantitativo de resistência à tração descrita por SANDRI e colaboradores (2004). Este método mede a força requerida para romper as ligações adesivas entre a membrana modelo e o polímero teste (SUDHAKAR *et al.*, 2006).

Os testes físicos de tração foram realizados com a Máquina universal de ensaios Modelo M.E.M 2000, com célula de carga 10 KgF e velocidade de deslocamento $t = 1\text{mm/min}$, área de contato 400 mm^2 e força inicial de contato de 0,2 N por 3 min – seguindo método similar ao utilizado por PEDRAZZI (1999).

Para garantir que os corpos de prova ficassem submersos no meio líquido (saliva artificial) durante o ensaio, foi desenvolvido um sistema de banho com um suporte *plex-glass* tipo gaveta acoplado ao mesmo. Os tecidos mucosos suínos foram aderidos a lâminas de *plex glass* com auxílio de adesivo de cianoacrilato. As lâminas foram então submersas no sistema de banho e presas à gaveta. A formulação teste foi espalhada sobre papel de filtro, o qual foi preso a um suporte de aço, com abertura superior anelar onde o gancho da pua de tração foi assentado. O suporte que contém a formulação é colocado em contato com a mucosa já submersa no banho de saliva artificial, e é lentamente deslocado, registrando a força de tensão ao longo do deslocamento. A medida de mucoadesão é dada pela força de tensão máxima obtida ao longo do deslocamento, que coincide com a força necessária para romper as ligações bioadesivas. A Figura 10 demonstra o esquema representativo do ensaio de mucoadesão.

O ensaio foi realizado apenas na ausência de mucina, pois segundo PEDRAZZI (1999) a comparação da força de mucoadesão em meio contendo ou não a mucina, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas.



(a)

(b)



(c)

(d)

FIGURA 10 - Esquema representativo do ensaio de mucoadesão. (a) e (b) preparo da amostra; (c) e (d) Máquina universal de ensaios - M.E.M 2000.

A composição da saliva artificial (pH = 6,8) utilizada nos ensaios de mucoadesão esta demonstrada na Tabela 1.

TABELA 1 - Composição da saliva artificial utilizada nos ensaios de mucoadesão

COMPOSIÇÃO DA SALIVA ARTIFICIAL	
Carboximetil celulose	8,0 g
Metilparabeno	1,0 g
Sorbitol 70%	24,0 g
Fosfato potássio monobásico	0,247 g
Cloreto de sódio	0,67 g
Cloreto de cálcio	0,1168 g
Cloreto de magnésio	0,0408 g
Cloreto de potássio	0,96 g
Água destilada q.s.p	964,938 mL

Os ensaios foram realizados com replicata de seis para cada formulação. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

3.2.7 Estudo de solubilidade e escolha da solução receptora

A determinação da solubilidade aquosa do celecoxibe foi realizada em vários meios constituídos de solução tampão fosfato de potássio pH 7,4 na ausência ou na presença de tensoativos em diferentes concentrações:

- Solução tampão fosfato pH 7,4
- Solução Tween 20 (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%) em tampão fosfato pH 7,4
- Solução Tween 80 (0,1%) em tampão fosfato pH 7,4
- Solução Lauril Sulfato de Sódio (0,3%) em tampão fosfato pH 7,4
- Solução Etanol (0,5%) em tampão fosfato pH 7,4

Um excesso de fármaco foi adicionado a 15 mL de cada solução testada, estas foram colocadas sob agitação por 12 horas. As soluções foram então centrifugadas a 2817 G por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado com membrana 0,45 μm e analisado por UV em $\lambda=255$ nm, determinado a partir da observação do comprimento de onda de máxima absorção do espectro de varredura. Foi preparada uma curva padrão de três pontos para cada solução testada para a quantificação da amostra.

A solução onde o celecoxibe apresentou maior solubilidade foi utilizada como solução receptora (SR) nos estudos de liberação e permeação *in vitro*. A solução receptora deve assegurar as condições *sink*, ou seja, deve ser capaz de solubilizar o fármaco liberado ou permeado através da membrana artificial ou natural respectivamente.

3.2.8 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação do CB nos ensaios de liberação e permeação *in vitro*

A metodologia utilizada para a quantificação do celecoxibe por CLAE foi ajustada baseada em métodos descritos na literatura (SUBRAMANIAN *et al.*, 2004; AYALASOMAYAJULA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006; HAUPT *et al.*, 2006).

3.2.8.1 Condições cromatográficas:

- Sistema Cromatográfico: HPLC Shimadzu LC -20 AT
- Coluna: Shim-pack CLC – C8 (5 μ m) 250 x 4 mm
- Fase móvel: Acetonitrila: tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 (70:30, v/v)
- Comprimento de onda: 254 nm
- Fluxo: 1 mL/min
- Temperatura: ambiente
- Tempo de corrida: 10 minutos
- Preparo da amostra em SR (Tween 20 a 1,5% em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4)

3.2.8.2 Preparo da solução mãe (SM) de CB

Foram pesados, com precisão analítica, quantidades equivalentes a 25,0 mg de CB com teor 96,62% e transferidos para um balão de 25 mL, cujo volume foi completado com fase móvel, resultando em solução com concentração de 1 mg/mL.

3.2.8.3 Preparo da solução estoque (SE) de CB

A partir da SM de 1 mg/mL, descrita no item acima, foi preparada uma diluição 1:10 utilizando solução receptora como diluente, obtendo solução estoque com concentração de CB de 100 μ g/mL.

3.2.8.4 Preparo da curva padrão

A partir da SE de 100 µg/mL, descrita no item acima, foram preparadas diluições de 1:100; 1:10; 2:10; 3:10 e 5:10 com solução receptora, obtendo-se soluções com concentrações de CB de 1,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 µg/mL.

3.2.8.5 Preparo da solução amostra

Foram pesadas com precisão analítica 50 mg de formulação contendo CB 2% p/p (correspondente a 1 mg de CB) colocadas em um becker contendo 15 mL de solução receptora e levadas ao ultrasson por 30 mim. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com SR., obtendo solução na concentração de 40 µg/mL. As amostras foram preparadas em triplicata.

3.2.8.6 Validação do método

O método foi validado segundo os requisitos da RE n° 899 (ANVISA, 2003), seguindo os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão de injeção, precisão inter e intra-day, exatidão, limite de detecção e quantificação.

Com o objetivo de se avaliar a linearidade do método, foram preparadas a partir da solução-estoque diluições de CB em cinco níveis de concentração. Para a análise de precisão do método, foram preparadas triplicatas da solução-estoque e suas respectivas diluições de CB (entre 10 e 30 µg/mL) foram preparadas e analisadas em dois dias consecutivos (n = 6, para cada ponto). A precisão foi avaliada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) intra-dia e inter-dias em cada ponto. Para determinar a precisão de injeção,

foram realizadas 10 injeções da amostra de CB na concentração de trabalho (10 µg/mL). A linearidade foi avaliada calculando-se os valores do intercepto (b), da inclinação (a) e do coeficiente de correlação (r), obtidos do total das réplicas analisadas, submetendo-os em seguida a testes estatísticos, para avaliação da regressão linear ($y = a + bx$).

3.2.9 Estudos de liberação *in vitro*

3.2.9.1 Preparo da solução receptora

Foi preparada uma solução tampão fosfato de potássio 0,02 M ajustando-se o pH para 7,4 com o auxílio de um potenciômetro e eletrodo DME CV1 em KCl. Adicionou-se Tween 20 para atingir concentração final de 1,5% (p/v) à solução tampão previamente preparada.

3.2.9.2 Montagem da célula de difusão modificada

A célula de difusão vertical modificada (Figura 11 a) foi montada utilizando-se a parte superior do aparelho de dissolução com a haste do aparato tipo cesta. O compartimento doador (Figura 11 b e 11 c) com área equivalente a 1,13 cm² de diâmetro foi acoplado à haste do dissolutor. A membrana artificial hidrofóbica (fluoropore) foi previamente hidratada em etanol e em seguida em água e posteriormente fixada ao compartimento doador com o auxílio de um anel de teflon (Figura 11 d). Bequeres de 250 mL foram utilizados como compartimento receptor e inseridos em banho termostatizado. A temperatura foi monitorada com o auxílio de um termômetro.

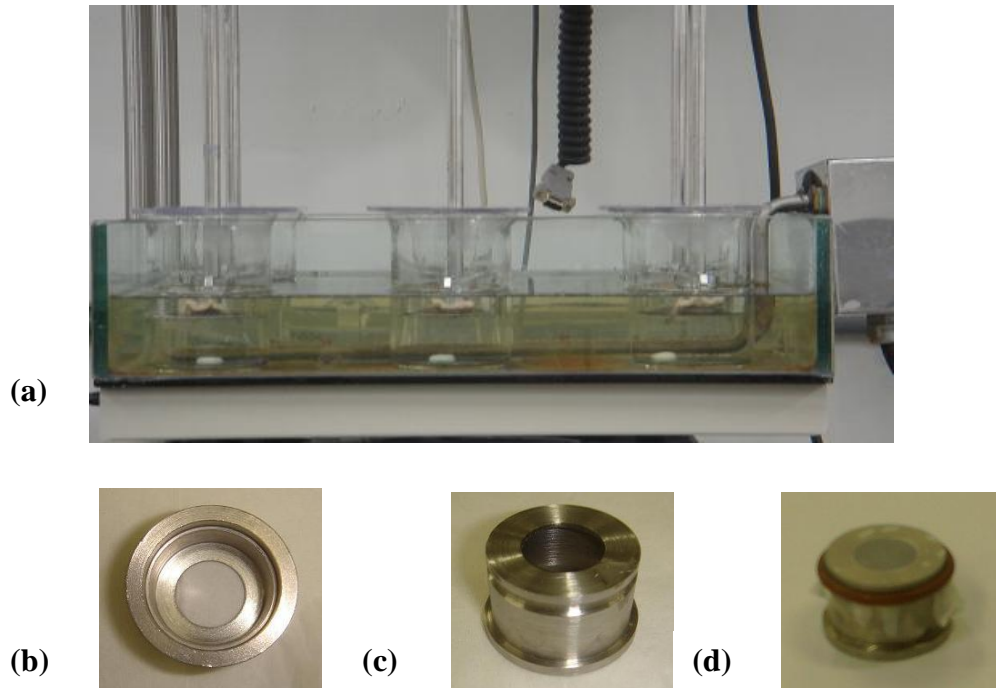


FIGURA 11 – Representação da célula de difusão vertical modificada (a); compartimento doador (b e c); compartimento doador com membrana e anel de teflon(d).

3.2.9.3 Condições de análise

O compartimento receptor foi preenchido com 100 mL de solução receptora (SR) que consiste de solução de Tween 20 (1,5%) em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4, mantido sob agitação durante o experimento, com o auxílio de barra magnética na velocidade de 500 rpm. A temperatura foi mantida a 37°C durante todo o experimento. Alíquotas de 1 mL de meio receptor foram retiradas nos tempos: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas, com reposição de igual volume de meio e quantificadas por CLAE. Os ensaios foram realizados para todas as formulações (item 3.2.5) com replicata de seis para cada formulação. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

3.2.9.4 Estudo de cinética e análise do fluxo de liberação *in vitro*

A determinação da cinética de liberação foi feita através da análise de regressão linear do gráfico de dispersão xy, aplicando três modelos:

- Ordem zero: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h);
- Higuchi: quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* raiz do tempo (h);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) *versus* tempo (h).

A partir da análise do coeficiente linear (r) obtido para cada um dos modelos, determinou-se a cinética de liberação. O modelo que apresentou maior valor de r foi o escolhido. O valor do fluxo de liberação (J) corresponde a inclinação (a) da porção linear da curva de liberação para cada formulação. O fluxo foi calculado para cada cuba (n=6) e o valor foi expresso pela média \pm o desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

3.2.10 Estudos de permeabilidade *in vitro* utilizando mucosa bucal de porco

3.2.10.1 Preparo da membrana natural

Mucosas de bochecha de porco foram obtidas de matadouro logo após a morte dos animais. A mucosa foi limpa, separada de tecido subjacente (muscular, adiposo e pele) e congelada a -20°C até o uso (Figura 12).



FIGURA 12 - Mucosa de bochecha suína após excisão e limpeza

3.2.10.2 Estudos de permeação *in vitro*

Para a realização dos estudos de permeação *in vitro* foi utilizada a célula de difusão vertical modificada descrita no item 3.2.9.2, utilizando membrana natural de mucosa bucal de porco. As condições de análise utilizadas foram as mesmas descritas no item 3.2.9.3. Os ensaios foram realizados com replicata de seis para cada formulação. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

3.2.10.3 Estudo de cinética e análise do fluxo de permeação *in vitro*

A determinação da cinética de permeação foi feita através da análise de regressão linear do gráfico de dispersão xy, aplicando três modelos, do mesmo modo descrito no item 3.2.9.4.

3.2.10.4 Estudos de retenção *in vitro*

Após os estudos de permeação, as mucosas foram retiradas do compartimento doador e o excesso de formulação foi retirado com auxílio de algodão embebido em água. Recortou-se a área correspondente à permeação e as mucosas foram então cortadas em pequenos pedaços e colocadas em tubos Falcon. Adicionou-se 5,0 mL de etanol em cada tubo e submeteu-se a trituração em ultra-turrax por 1 min. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e posteriormente em unidade descartável filtrante de poro 0,45 µm. A quantidade retida na mucosa após 24 horas foi quantificada por CLAE.

Os ensaios foram realizados com replicata de seis para cada formulação. A análise estatística foi realizada através do teste One-way ANOVA (teste de múltiplas comparações de Tukey).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO FÁRMACO CELECOXIBE

4.1.1 Determinação da massa obtida após extração e recristalização

- Massa inicial: Conteúdo de 170 cápsulas equivalente a 34,0 g de celecoxibe
- Massa obtida: 26,10 g
- Rendimento: 76,76%

4.1.2 Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão foi realizado em triplicata e considerou-se a média entre as três leituras.

- Ponto de fusão = 161 – 163 ° C
- Ponto de fusão literatura = 157 – 159° C (The Merk Index, 2001)

4.1.3 Espectrometria de infravermelho

O espectro de infravermelho da amostra de celecoxibe em KBr está representado na Figura 13.

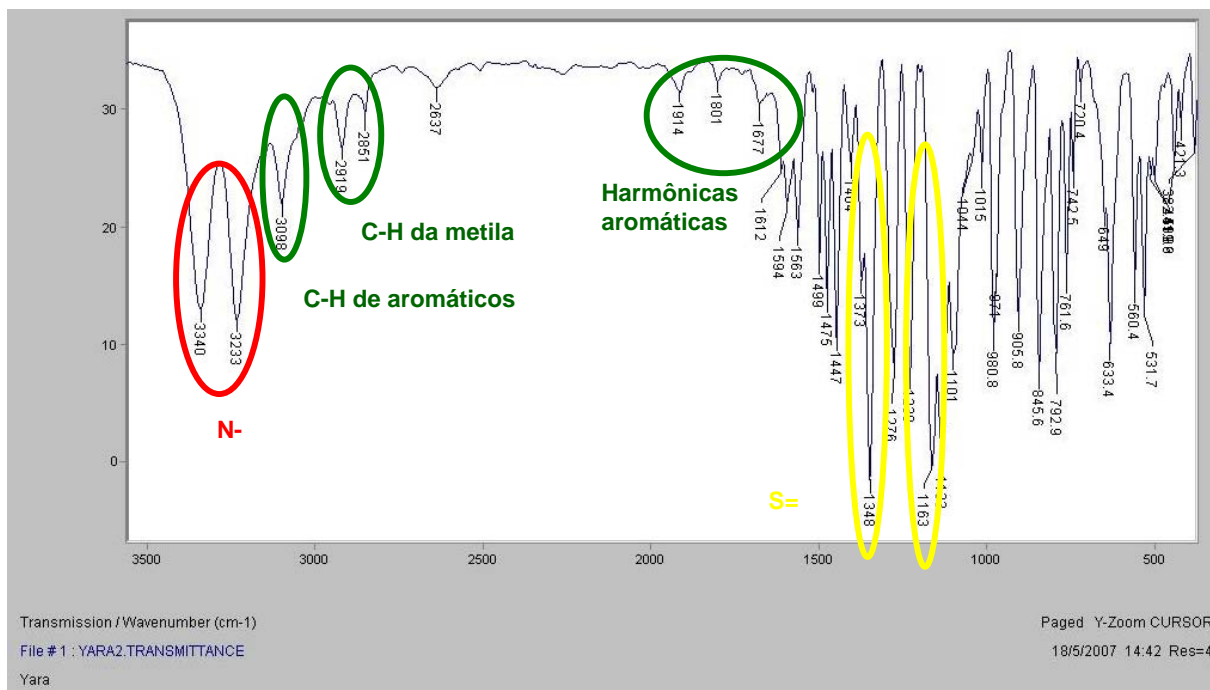


FIGURA 13 – Espectro de infravermelho do CB obtido experimentalmente

4.1.4 Ressonância magnética nuclear

A Figura 14 representa os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio do celecoxibe.

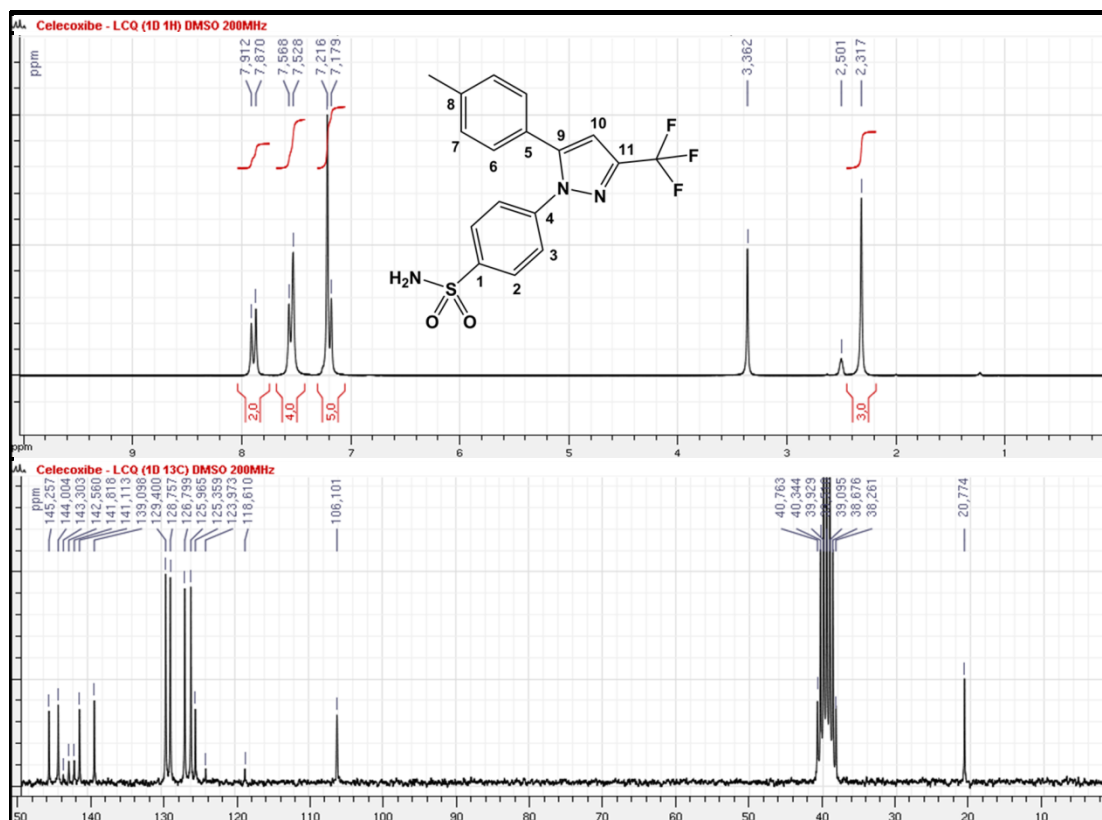


FIGURA 14 – Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio do CB

4.2 QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO CELECOXIBE

Após extração e recristalização, o fármaco foi quantificado frente a um padrão de trabalho com teor conhecido (99,4%), adquirido comercialmente, por espectrofotometria de UV-Vis. A seletividade do método pode ser demonstrada através da observação da ausência de interferentes nos espectros de varredura do padrão e da amostra observados na Figura 15.

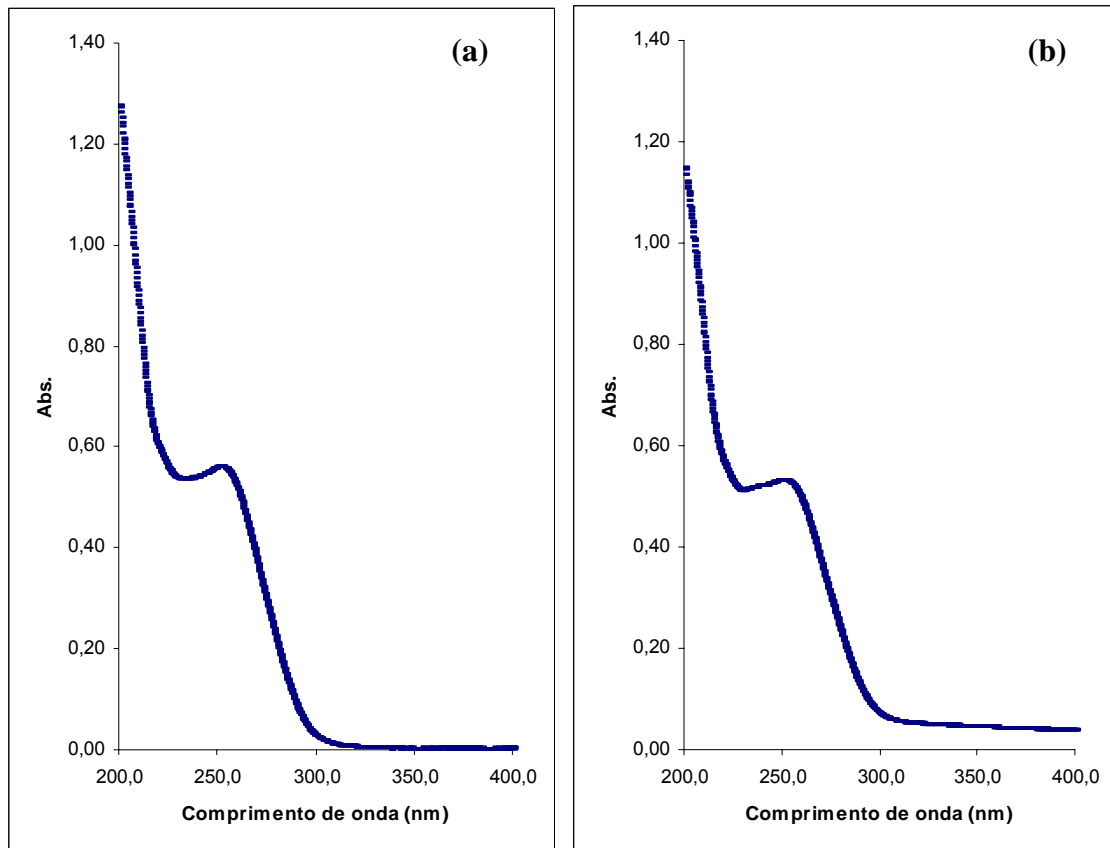


FIGURA 15 - Seletividade do método para quantificação do CB extraído – espectro de varredura (a) padrão) (b) amostra

A Figura 16 representa a curva de calibração obtida a partir do padrão de celecoxibe. A equação da reta é $y = 0,0514x + 0,0025$ e o coeficiente de correlação $r = 1,00$. Como o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação, segundo a RE n° 899, é de 0,99 pode-se dizer que existe uma relação linear definida (ANVISA, 2003).

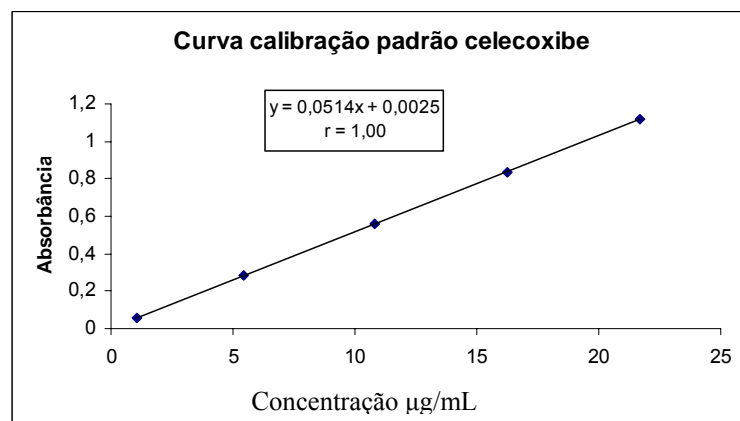


FIGURA 16 – Curva de calibração do padrão para quantificação de CB

A tabela abaixo mostra os resultados de teor obtidos das amostras de celecoxibe extraídos de cápsulas de Celebra[®] frente à curva de calibração do padrão de trabalho (curva de calibração acima).

TABELA 2 – Quantificação do CB extraído por Espectrofotometria UV-Vis

N	Teor (%)	Teor médio (%)	DP	DPR (%)
1	97,06			
2	96,32	96,62	0,39	0,40
3	96,47			

4.3 OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES

A Tabela 3 representa as formulações desenvolvidas e suas respectivas porcentagens de QT e AZ.

TABELA 3 – Formulações desenvolvidas de CB 2% (p/p) contendo QT na ausência (Controle) e na presença de AZ.

Formulações	Quitosano	Azona
Controle EtOH	-	-
Controle QT 1%		-
QT 1% + AZ 1%		1%
QT 1% + AZ 2%	1%	2%
QT 1% + AZ 3%		3%
Controle QT 2%		-
QT 2% + AZ 1%		1%
QT 2% + AZ 2%	2%	2%
QT 2% + AZ 3%		3%
Controle QT 3%		-
QT 3% + AZ 1%		1%
QT 3% + AZ 2%	3%	2%
QT 3% + AZ 3%		3%

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES

4.4.1 Determinação do pH das formulações

A Tabela 4 representa os valores de pH das formulações desenvolvidas.

TABELA 4 - Determinação do pH das formulações desenvolvidas

<i>Formulações</i>	pH
Matriz QT 1%*	3,42
Controle QT 1%	4,36
QT 1% + AZ 1%	4,36
QT 1% + AZ 2%	4,34
QT 1% + AZ 3%	4,36
Matriz QT 2%*	4,44
Controle QT 2%	5,09
QT 2% + AZ 1%	5,10
QT 2% + AZ 2%	5,10
QT 2% + AZ 3%	5,11
Matriz QT 3%*	5,92
Controle QT 3%	5,89
QT 3% + AZ 1%	5,83
QT 3% + AZ 2%	5,84
QT 3% + AZ 3%	5,84

(*) Matriz QT corresponde ao gel puro de QT, ou seja, na ausência de CB e AZ.

4.4.2 Comportamento reológico das formulações

Os reogramas obtidos estão representados nas Figuras 17, 18, 19 e 20.

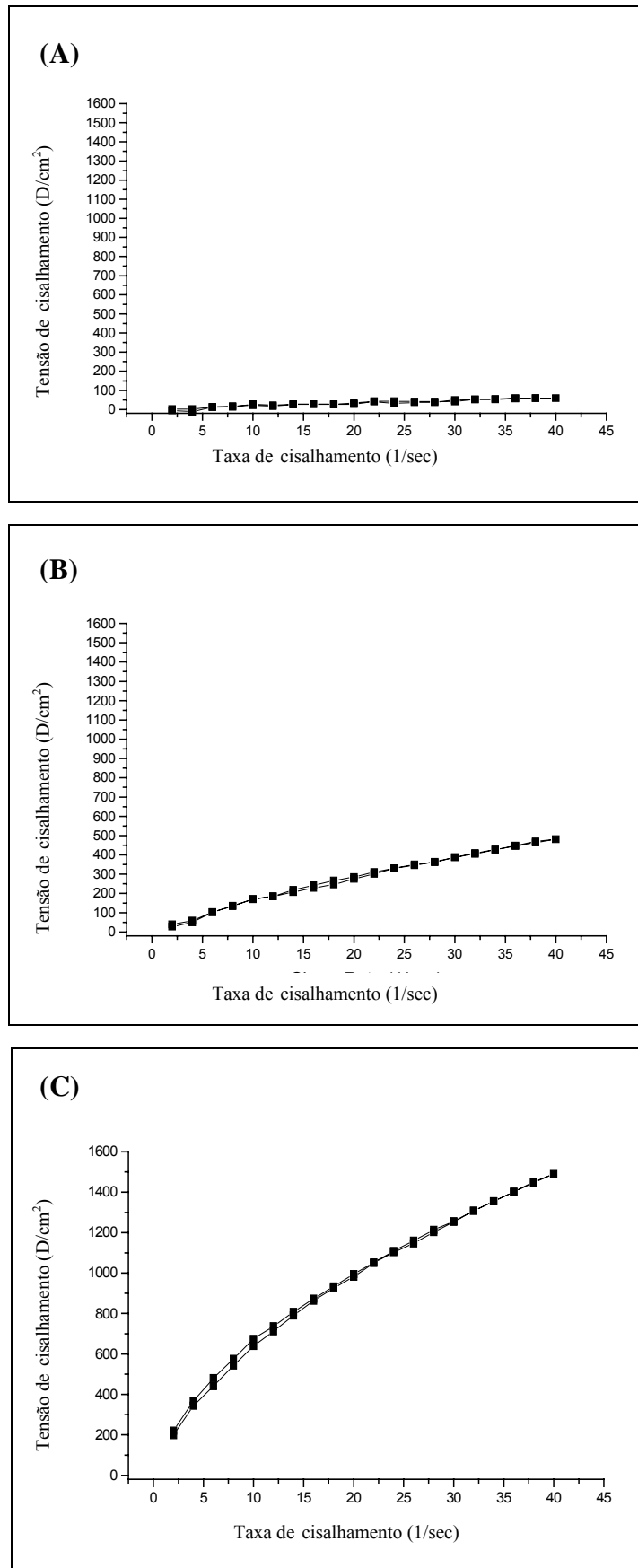


FIGURA 17 – Reograma das formulações matrizes de QT 1% (A); 2% (B) e 3% (C) na ausência de CB e AZ.

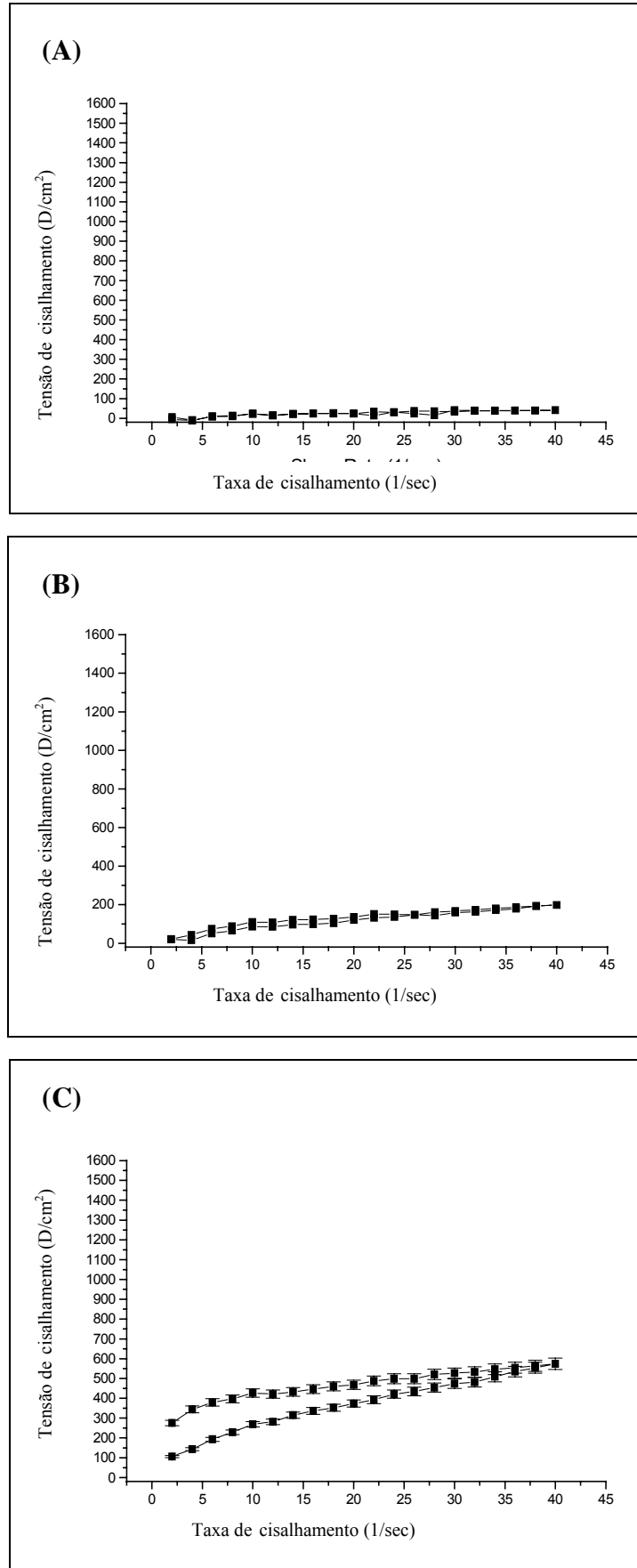


FIGURA 18 - Reograma das formulações controle de QT 1% (A); 2% (B) e 3% (C) contendo CB 2% (p/p) e na ausência de AZ.

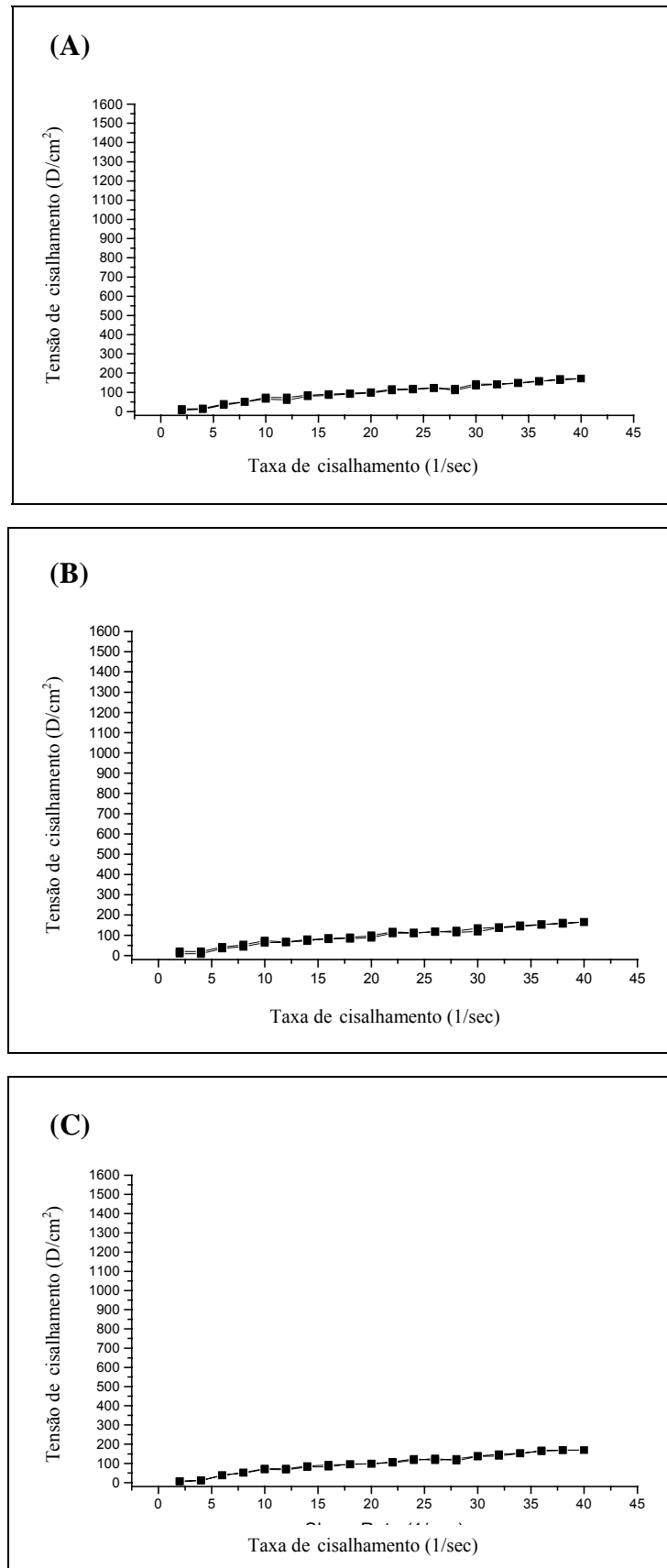


FIGURA 19 - Reograma das formulações de QT 2% contendo CB 2% (p/p) e na presença de AZ 1% (A); 2% (B) e 3% (C).

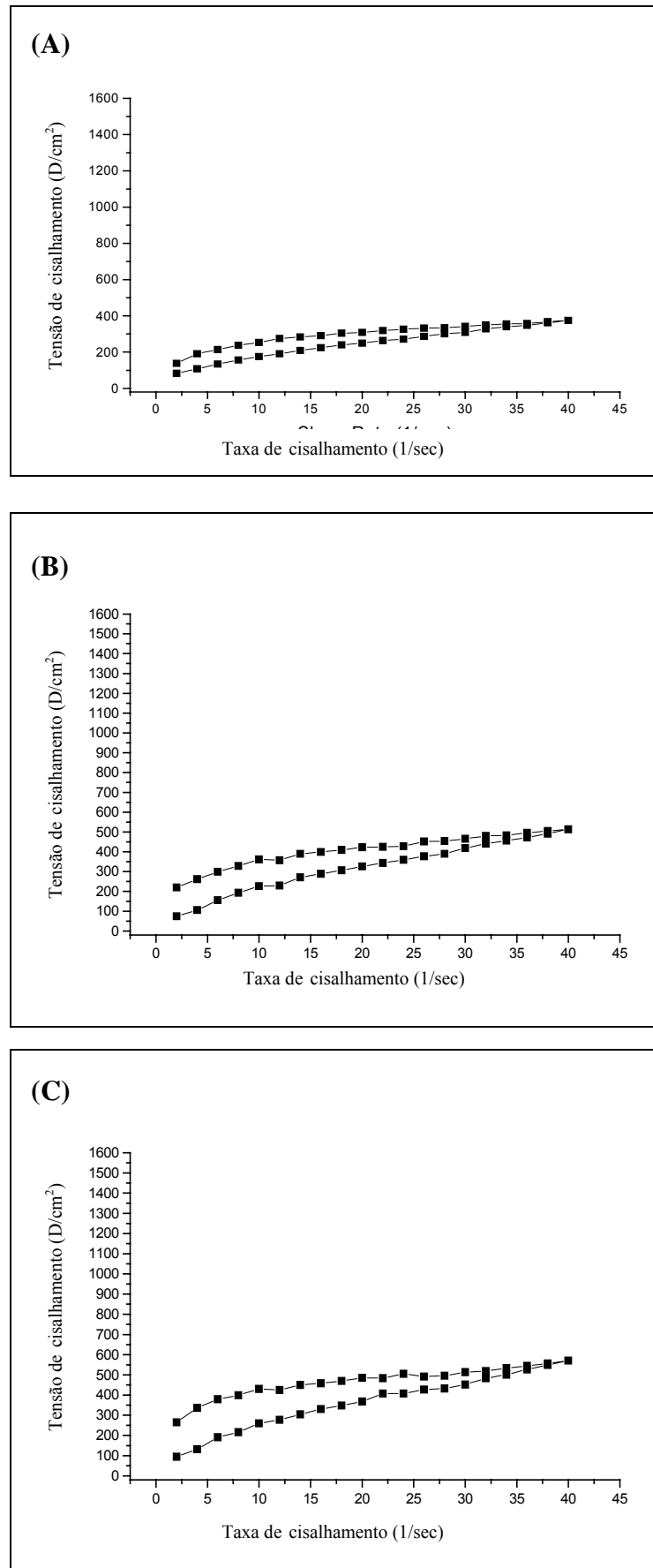


FIGURA 20 - Reograma das formulações de QT 3% contendo CB 2% (p/p) e na presença de AZ 1% (A); 2% (B) e 3% (C).

TABELA 5 - Parâmetros reológicos das formulações testadas

Formulações	Índice de fluxo	Índice de consistência	Viscosidade aparente	<i>Tixotropia</i>
Matriz QT 1 %	X	X	58,98	-11796
Matriz QT 2%	0,89	1897	481,67	-192,67
Matriz QT 3%	0,64	14450	1490,23	497,40
Controle QT 1%	X	X	41,28	-86,50
Controle QT 2%	0,74	1366	198,57	599,63
Controle QT 3%	0,39	13068	574,07	3688,27
QT 2% + AZ 1%	0,98	523,9	171,04	163,18
QT 2% + AZ 2%	0,88	678,1	165,14	194,63
QT 2% + AZ 3%	1,03	441,7	169,08	96,33
QT 3% + AZ 1%	0,41	8116	375,51	1950,27
QT 3% + AZ 2%	0,46	9381	513,13	3275,36
QT 3% + AZ 3%	0,41	12987	570,14	3898,58

4.4.3 Estudo das propriedades de mucoadesão – força de tensão

A Tabela 6 e a Figura 21 representam os resultados da medida de mucoadesão para as formulações de QT (1%, 2% e 3%) na presença de AZ 1%.

TABELA 6 - Medidas de mucoadesão – Força de tensão (mN) das formulações QT 1%; 2% e 3% contendo AZ 1% (p/p).

Formulações	Força (mN)						Média	DP	DPR
QT 1% + AZ 1%	80	90	60	40	130	150	93,33	41,79	44,78
QT 2% + AZ 1%	90	140	150	90	120	90	115	27,39	23,81
QT 3% + AZ 1%	230	160	160	220	240	170	195	38,34	19,66

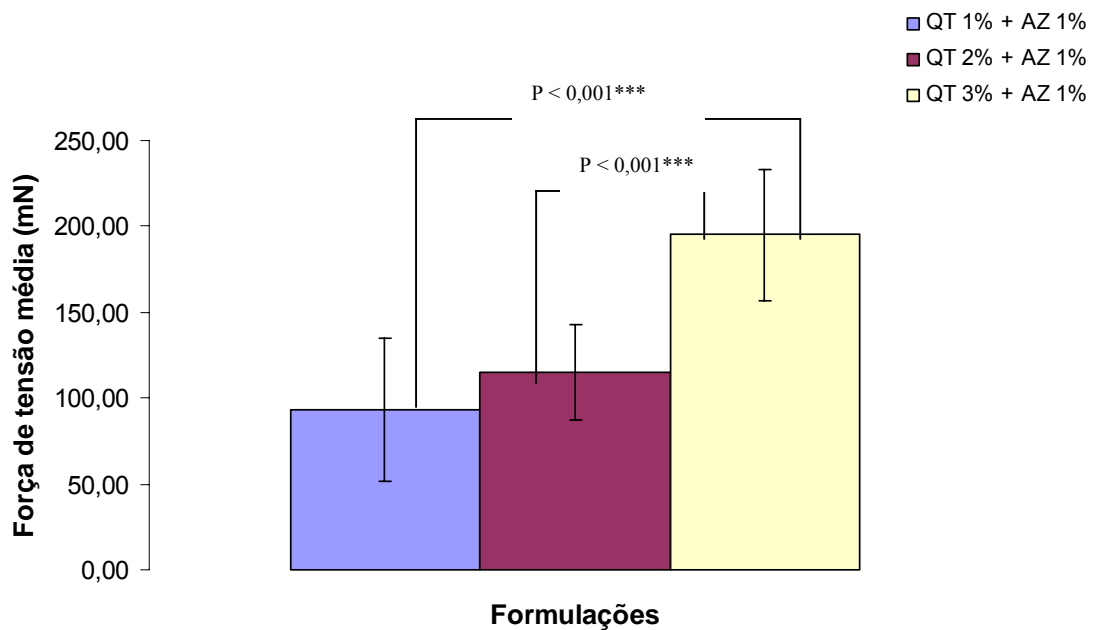


FIGURA 21 - Medidas de mucoadesão – Força de tensão (mN) das formulações QT 1%; 2% e 3% contendo AZ 1% (p/p). Valores médios e seus desvios padrão (n=6) para cada grupo. Significativo para $P < 0,05$. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey)

4.5 SOLUBILIDADE E ESCOLHA DA SOLUÇÃO RECEPTORA

A Tabela 7 representa as solubilidades ($\mu\text{g/mL}$) do CB em diferentes meios (solução receptora).

TABELA 7 – Teste preliminar para escolha da solução receptora

Solução receptora	Solubilidade CB ($\mu\text{g/mL}$)
Tampão fosfato pH 7,4	1,38
Lauril Sulfato de Sódio (0,3%)	5,19
Etanol (0,5%)	1,30
Tween 20 (0,5%)	141,85
Tween 80 (0,1%)	39,53

TABELA 8 – Escolha da concentração de Tween 20

Solução receptora	Solubilidade CB ($\mu\text{g/mL}$)
Tween 20 (0,5%)	140,94
Tween 20 (1,0%)	284,56
Tween 20 (1,5%)	472,84
Tween 20 (2,0%)	625,63

4.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DO CB NOS ENSAIOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO *IN* *VITRO*

4.6.1 Condições cromatográficas

- Coluna Shim-pack CLC – C8 (5µm) 250 x 4 mm;
- Fluxo: 1mL/min;
- Temperatura: ambiente;
- Comprimento de onda: 254 nm;
- Preparo da amostra em SR composta de Tween 20 (1,5%) em tampão fosfato 0,02M pH 7,4;
- Fase móvel: Acetonitrila: tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 (70:30).

4.6.2 Validação da metodologia analítica:

4.6.2.1 Seletividade

Este ensaio mostra a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A Figura 22 representa os cromatogramas de injeção da formulação placebo em comparação com a injeção da formulação contendo o fármaco CB.

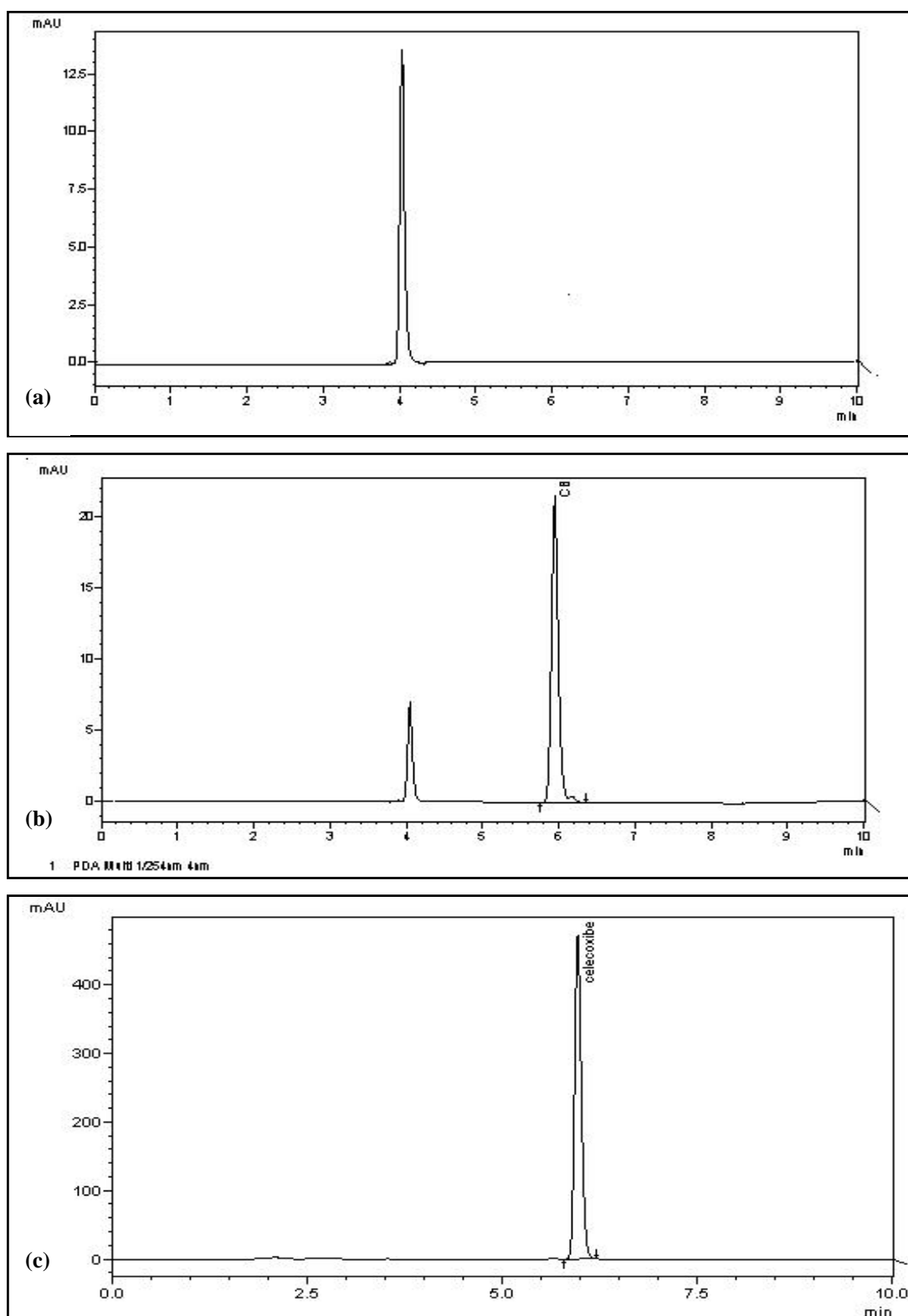


FIGURA 22 - Cromatogramas de injeção (a) formulação placebo (b) formulação contendo CB (c) formulação contendo CB em maiores concentrações.

A Figura 23 representa o gráfico de *ratiosgrams*, sobreposição de espectros e espectro de varredura a fim de demonstrar a seletividade do método.

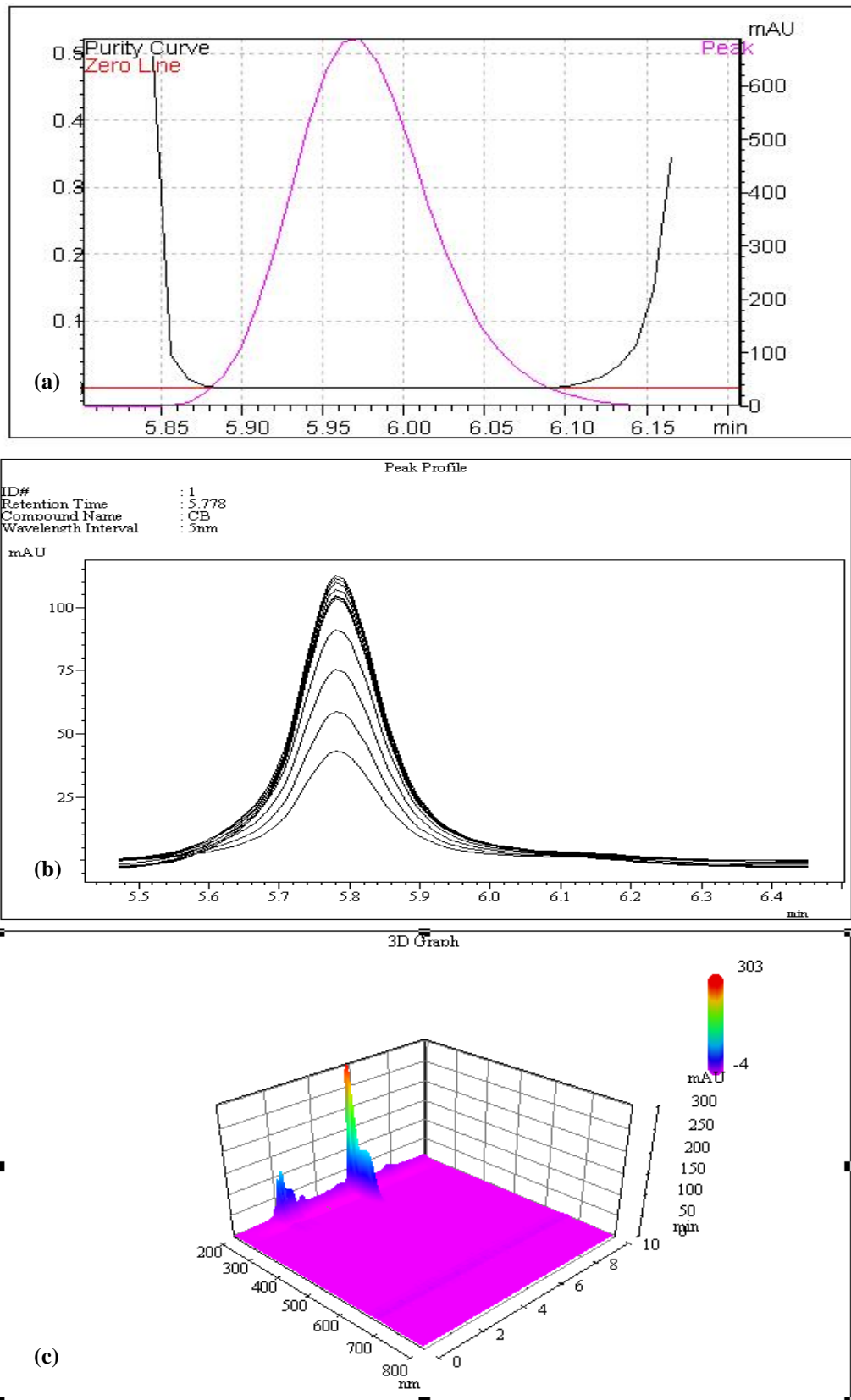


FIGURA 23 – Seletividade do método – (a) gráfico de *radiograms* (b) sobreposição de espectros e (c) espectro de varredura.

4.6.2.2 Linearidade

As curvas padrão médias estão demonstradas na Figura 24.

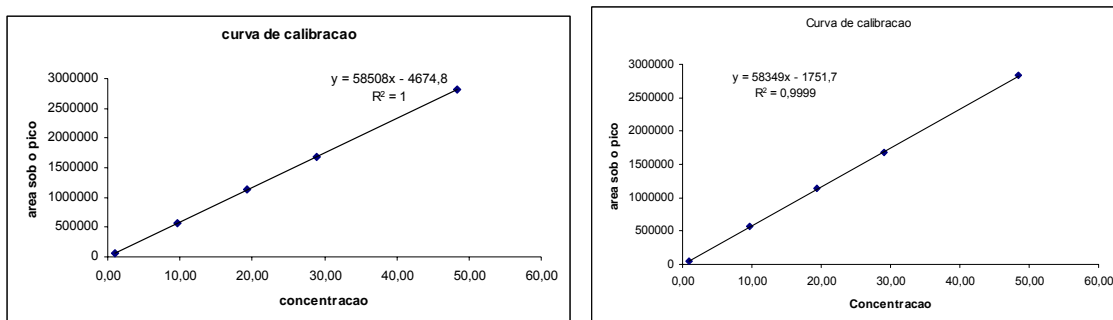


FIGURA 24 – Curva padrão média do 1º e 2º dia de testes

Os dados apresentados na Figura 24 estão desmostrados na Tabela 9, de forma mais detalhada, com intuito de demonstrar a linearidade do método.

TABELA 9 – Análise de linearidade do método

Parâmetros avaliados	Dia 1	Dia 2
a	58349	58508
b	-1751,7	-4674,8
r	0,99997	0,99999

A linearidade foi comprovada face aos valores de inclinação significativos e aos valores de coeficiente de correlação linear superiores a 0,99.

4.6.2.3 Repetibilidade e precisão intermediária

A Tabela 10 representa os resultados obtidos no ensaio de repetibilidade e precisão intermediária.

TABELA 10 - Repetibilidade e precisão intermediária

Concentração	Dia	Área sob o pico	DP	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
10 µg mL	1	565747	2714,17	0,48	0,90
		570432			
		565715			
	2	562409	3211,33	0,57	
		559665			
		556008			
20 µg mL	1	1097618	1740,57	0,16	0,33
		1096124			
		1099594			
	2	1103922	5530,54	0,50	
		1092861			
		1098428			
30 µg mL	1	1647470	24183,38	1,45	0,98
		1695576			
		1667175			
	2	1677754	11077,53	0,66	
		1662088			
		1661682			

4.6.2.4 Precisão de injeção

A Tabela 11 demonstra os resultados da precisão de injeção. Foram realizadas 10 injeções da concentração de trabalho (10µg/mL) para verificar a repetitividade. A precisão de injeção do cromatógrafo pode ser demonstrada quando os valores de DPR encontrados forem menores que 2%.

TABELA 11 - Precisão de injeção

N	Área sob o pico	Média	DP	DPR (%)
1	2857525			
2	2862752			
3	2869932			
4	2843448			
5	2821454	2848924	17612,79	0,62
6	2852638			
7	2815920			
8	2855611			
9	2861291			
10	2848672			

4.6.2.5 Exatidão

A Tabela 12 demonstra os resultados do ensaio de exatidão realizado pelo método do placebo contaminado, na qual uma quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes da formulação.

TABELA 12 – Exatidão do método

	Quantidade adicionada (mg)	Quantidade recuperada (mg)	N	Recuperação (%)	DPR (%)
80%	32,90	32,82	3	99,75	0,79
100%	39,30	39,37	3	100,18	0,77
120%	47,80	48,43	3	101,32	1,83

4.6.2.6 Limite de quantificação e detecção

A estimativa do limite de detecção (LD) pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. O limite de quantificação (LQ) é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. O LD e LQ podem ser expressos pelas equações abaixo:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Onde:

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

IC = inclinação da curva de calibração.

TABELA 13 – Valores de limite de quantificação e limite de detecção

		Média	DP	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
	59210				
a	61738	59765,67	1761,51		
	58349			0,04	0,12
	-17043				
b	-16097	-16885,67	722,96		
	-17517				

4.7 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

4.7.1 Perfil de liberação *in vitro*

A Tabela 14 representa os resultados dos estudos de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas.

TABELA 14 – Quantidades cumulativas de CB liberado em cada tempo na SR nos estudos de liberação *in vitro* (n = 6) das formulações CB (2% p/p) em etanol (controle EtOH) e em QT 1%, 2% e 3% na ausência (Controle) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%)

Tempo (h)	Controle EtOH - Quantidade de CB liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP			
1	361,23 \pm 61,68			
2	578,40 \pm 95,43			
4	883,22 \pm 157,77			
6	1116,11 \pm 184,12			
8	1283,72 \pm 195,68			
10	1441,03 \pm 214,36			
12	1564,12 \pm 241,74			
24	2263,78 \pm 212,16			
	QT 1% - Quantidade de CB liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP			
	Controle	AZ 1%	AZ 2%	AZ 3%
1	60,79 \pm 5,46	13,21 \pm 12,58	41,22 \pm 5,65	27,79 \pm 0,83
2	130,34 \pm 13,57	49,91 \pm 18,66	59,79 \pm 6,78	32,53 \pm 1,42
4	242,63 \pm 18,55	131,70 \pm 28,64	94,18 \pm 8,46	41,83 \pm 2,99
6	329,43 \pm 22,05	205,26 \pm 32,84	127,87 \pm 9,04	52,48 \pm 4,65
8	416,78 \pm 23,40	265,53 \pm 36,60	157,40 \pm 8,59	62,41 \pm 6,18
10	500,59 \pm 20,25	295,55 \pm 80,41	194,74 \pm 8,58	71,32 \pm 7,22
12	576,06 \pm 18,77	374,29 \pm 48,38	223,72 \pm 9,13	81,17 \pm 7,82
24	883,05 \pm 49,18	726,21 \pm 61,18	437,33 \pm 17,75	151,75 \pm 12,08
	QT 2% - Quantidade de CB liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP			
	Controle	AZ 1%	AZ 2%	AZ 3%
1	3,40 \pm 0,98	5,30 \pm 3,19	9,08 \pm 5,02	2,58 \pm 0,24
2	29,71 \pm 8,61	25,66 \pm 5,66	6,63 \pm 2,21	9,83 \pm 1,10
4	82,33 \pm 16,16	74,78 \pm 10,24	33,38 \pm 1,42	33,81 \pm 3,10
6	135,00 \pm 23,99	138,83 \pm 10,27	56,94 \pm 3,60	64,64 \pm 18,71
8	176,68 \pm 21,29	192,63 \pm 16,26	80,74 \pm 5,53	79,88 \pm 6,60
10	216,18 \pm 23,91	252,27 \pm 17,66	111,36 \pm 7,45	105,62 \pm 8,05
12	248,25 \pm 25,73	294,70 \pm 25,32	137,28 \pm 10,75	129,98 \pm 7,67
24	442,39 \pm 38,29	580,77 \pm 46,79	279,07 \pm 29,01	300,92 \pm 20,03
	QT 3% - Quantidade de CB liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP			
	Controle	AZ 1%	AZ 2%	AZ 3%
1	24,66 \pm 9,59	49,65 \pm 4,82	60,99 \pm 1,16	73,76 \pm 2,45
2	77,31 \pm 9,24	77,66 \pm 8,77	70,57 \pm 16,50	83,01 \pm 18,39
4	134,52 \pm 11,86	131,01 \pm 13,25	119,25 \pm 7,97	95,83 \pm 15,39
6	190,67 \pm 13,45	180,87 \pm 18,12	138,22 \pm 9,41	131,04 \pm 7,34
8	235,92 \pm 15,39	224,28 \pm 23,18	157,67 \pm 12,89	153,73 \pm 7,61
10	277,59 \pm 19,62	270,23 \pm 26,80	188,02 \pm 10,19	175,08 \pm 7,85
12	313,18 \pm 22,00	302,40 \pm 30,31	214,00 \pm 14,47	195,27 \pm 7,65
24	550,93 \pm 35,01	508,28 \pm 41,95	345,76 \pm 18,17	310,77 \pm 15,65

TABELA 15 - Resumo dos dados estatísticos da quantidade de CB acumulado no meio receptor após 24 horas de estudo de liberação *in vitro* das formulações em Etanol (Controle EtOH) e em diferentes concentrações de QT e AZ .

Comparação formulações	Significância ^a
Controle EtOH X Controle QT 1%	P < 0,001***
Controle EtOH X Controle QT 2%	P < 0,001***
Controle EtOH X Controle QT 3%	P < 0,001***
Controle QT 1% X Controle QT 2%	P < 0,001***
Controle QT 1% X Controle QT 3%	P < 0,05*
Controle QT 2% X Controle QT 3%	P > 0.05
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 1%	P < 0,001***
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 2%	P < 0,001***
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 2%	P < 0,001***
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 1% + AZ 2% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,001***
Controle QT 2% X QT 2% + AZ 1%	P < 0,001***
Controle QT 2% X QT 2% + AZ 2%	P < 0,001***
Controle QT 2% X QT 2% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 2%	P < 0,001***
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 2% + AZ 2% X QT 2% + AZ 3%	P > 0.05
Controle QT 3% X QT 3% + AZ 1%	P < 0,01**
Controle QT 3% X QT 3% + AZ 2%	P < 0,001***
Controle QT 3% X QT 3% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 2%	P < 0,001***
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 3% + AZ 2% X QT 3% + AZ 3%	P > 0.05

(^a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey)

A figura abaixo representa o perfil de liberação do CB encontrado ao longo de 24 horas para as formulações Controle EtOH (na ausência de QT) e Controle QT (1%, 2% e 3% p/p) na ausência do promotor de penetração AZ.

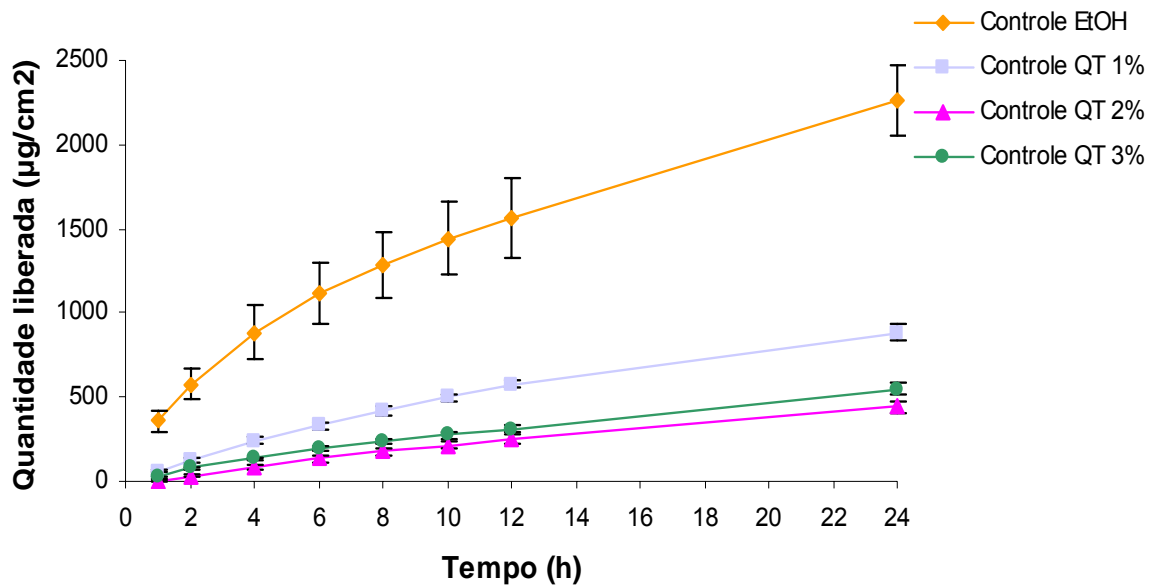


FIGURA 25 - Quantidade de CB liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) das formulações na ausência de AZ, contendo QT a 1% (Controle QT 1%), 2% (Controle QT 2%) e 3% (Controle QT 3%) e na ausência de QT (Controle EtOH).

A influência do promotor de penetração AZ nas concentrações 1%, 2% e 3% também foi analisada para cada concentração de QT. A Figura 26 representa o perfil de liberação do CB encontrado ao longo de 24 horas para as formulações contendo QT 1% (A), 2% (B) e 3% (C) na ausência (Controle QT) na presença do promotor de penetração AZ (1%, 2% e 3%).

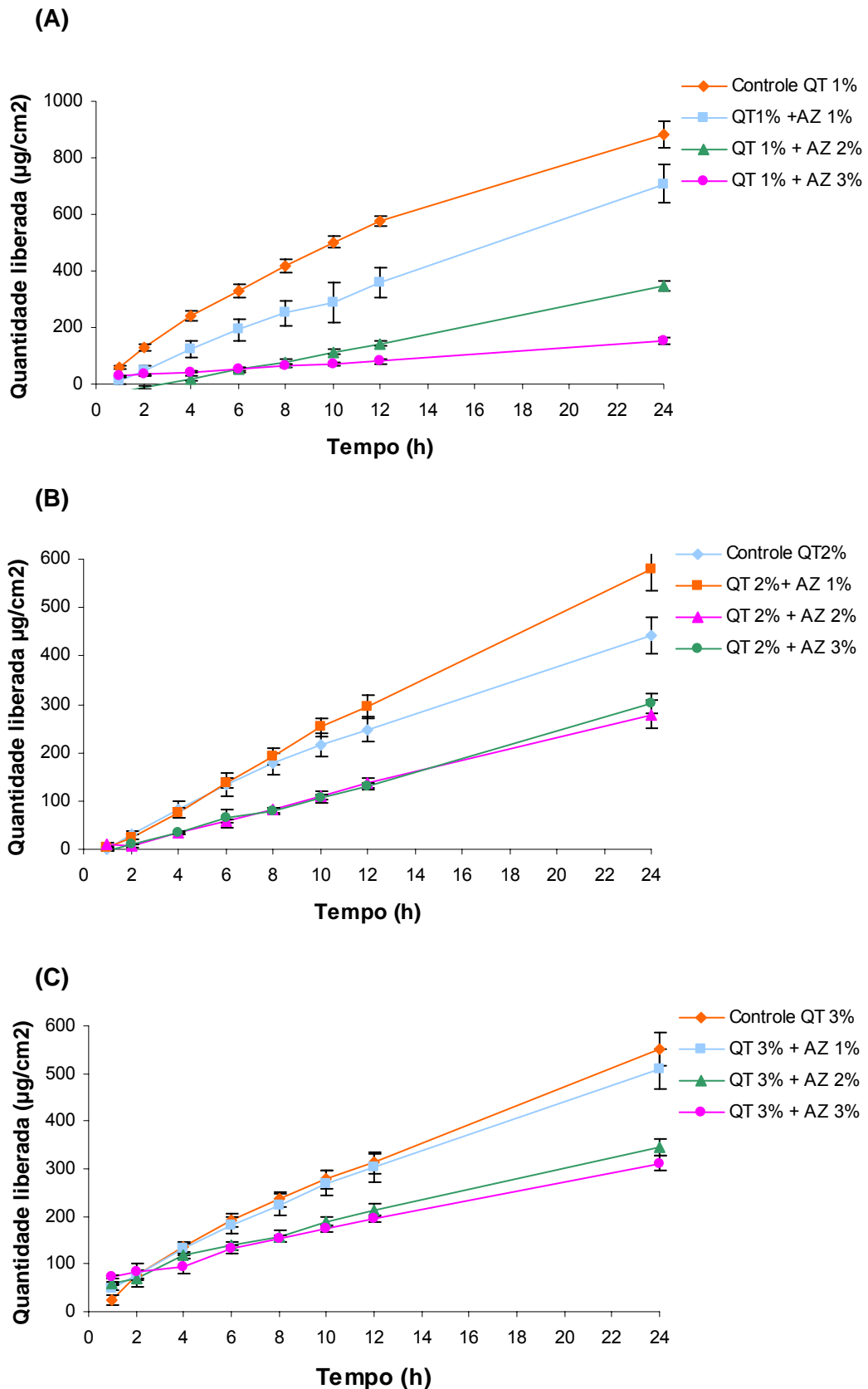


FIGURA 26 - Quantidade de CB liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) das formulações contendo QT 1% (A); 2% (B) e 3% (C) na ausência (Controle QT) e na presença do promotor de penetração AZ 1%, 2% e 3%.

4.7.2 Estudo de cinética e análise do fluxo de liberação *in vitro*

A partir do perfil de liberação pode-se determinar a cinética para cada formulação. Para isso, escolheu-se a porção mais linear de cada perfil e aplicou-se os três modelos cinéticos (item 3.2.9.4) para determinação da equação da reta de regressão linear ($y = ax + b$). O modelo que apresentou maior valor de correlação linear r (mais próximo de 1) foi escolhido como modelo cinético do estudo. O valor de fluxo (J) corresponde ao valor de inclinação (a) da equação da reta de regressão linear. Os valores de fluxo (J) e correlação linear (r) das formulações analisadas estão demonstrados na Tabela 16.

TABELA 16 – Determinação do fluxo (J) e cinética de liberação ($n = 6$) das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de AZ (1%, 2% e 3%).

Formulações	Fluxo (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$) \pm DP	Correlação linear (r)	Modelo cinético
Controle EtOH	433,11 \pm 88,41	0,9978	Pseudo-primeira ordem
Controle QT 1%	34,99 \pm 6,99	0,9850	Ordem zero
QT 1% + AZ 1%	29,98 \pm 3,26	0,9810	Ordem zero
QT 1% + AZ 2%	15,18 \pm 1,81	0,9982	Ordem zero
QT 1% + AZ 3%	4,87 \pm 1,27	0,9952	Ordem zero
Controle QT 2%	16,80 \pm 5,08	0,9936	Ordem zero
QT 2% + AZ 1%	25,37 \pm 2,08	0,9984	Ordem zero
QT 2% + AZ 2%	12,99 \pm 2,34	0,9980	Ordem zero
QT 2% + AZ 3%	13,08 \pm 0,94	0,9926	Ordem zero
Controle QT 3%	22,09 \pm 1,47	0,9920	Ordem zero
QT 3% + AZ 1%	20,93 \pm 3,09	0,9948	Ordem zero
QT 3% + AZ 2%	13,18 \pm 2,22	0,9923	Ordem zero
QT 3% + AZ 3%	10,49 \pm 0,72	0,9917	Ordem zero

TABELA 17 - Resumo dos dados estatísticos do fluxo de liberação após 24 horas de estudo das formulações CB 2% (p/p) em Etanol (Controle EtOH) e em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).

Comparação entre as formulações	Significância ^a
Controle QT 1% X Controle QT 2%	P < 0,001***
Controle QT 1% X Controle QT 3%	P < 0,001***
Controle QT 2% X Controle QT 3%	P > 0,05
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 1%	P > 0,05
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 2%	P < 0,001***
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 2%	P < 0,001***
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 1% + AZ 2% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,001***
Controle QT 2% X QT 2% + AZ 1%	P < 0,01**
Controle QT 2% X QT 2% + AZ 2%	P > 0,05
Controle QT 2% X QT 2% + AZ 3%	P > 0,05
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 2%	P < 0,001***
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 2% + AZ 2% X QT 2% + AZ 3%	P > 0,05
Controle QT 3% X QT 3% + AZ 1%	P > 0,05
Controle QT 3% X QT 3% + AZ 2%	P < 0,001***
Controle QT 3% X QT 3% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 2%	P < 0,01**
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 3% + AZ 2% X QT 3% + AZ 3%	P > 0,05

(^a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey)

4.8 ESTUDOS DE PERMEABILIDADE *IN VITRO* USANDO MUCOSA BUCAL DE PORCO

4.8.1 Estudo de permeação *in vitro*

A Tabela 18 demonstra as quantidades de CB permeado através do tempo para as formulações desenvolvidas. A Tabela 19 mostra o resumo dos dados estatísticos dos estudos de permeação *in vitro*. A Figura 27 representa o perfil de permeação do CB encontrado ao longo de 24 horas para as formulações contendo QT 1% (A), 2% (B) e 3% (C) na ausência (Controle QT) e na presença do promotor de penetração AZ 1%, 2% e 3%.

TABELA 18 – Quantidades cumulativas de CB permeado em cada tempo na SR nos estudos de permeação *in vitro* (n = 6) das formulações CB em QT 1%, 2% e 3% na ausência (Controle) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).

Tempo (h)	QT 1% - Quantidade de CB permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP			
	Controle	AZ 1%	AZ 2%	AZ 3%
1	44,82 \pm 1,68	29,35 \pm 0,82	28,90 \pm 0,75	30,21 \pm 0,83
2	44,67 \pm 0,72	29,91 \pm 0,44	29,72 \pm 0,31	31,08 \pm 1,09
4	45,41 \pm 1,19	31,76 \pm 0,30	30,93 \pm 0,35	32,19 \pm 1,51
6	44,66 \pm 0,42	31,89 \pm 0,29	30,72 \pm 0,44	35,52 \pm 3,36
8	46,07 \pm 0,87	32,44 \pm 0,45	31,71 \pm 0,17	36,69 \pm 4,56
10	47,58 \pm 1,21	33,63 \pm 0,65	32,50 \pm 0,50	38,59 \pm 2,88
12	49,16 \pm 1,57	33,43 \pm 1,92	32,48 \pm 1,63	40,58 \pm 3,59
24	56,68 \pm 3,23	35,50 \pm 0,97	31,16 \pm 0,96	46,19 \pm 5,71
	QT 2% - Quantidade de CB permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP			
	AZ 1%	AZ 2%	AZ 3%	
1	25,31 \pm 0,00	25,31 \pm 0,00	25,31 \pm 0,00	
2	25,57 \pm 0,00	25,57 \pm 0,00	25,57 \pm 0,00	
4	25,82 \pm 0,00	25,82 \pm 0,00	25,82 \pm 0,00	
6	26,07 \pm 0,00	26,07 \pm 0,00	26,07 \pm 0,00	
8	26,61 \pm 0,69	26,33 \pm 0,00	26,33 \pm 0,00	
10	27,22 \pm 1,00	26,58 \pm 0,00	26,58 \pm 0,00	
12	27,82 \pm 1,53	26,83 \pm 0,00	26,83 \pm 0,00	
24	32,54 \pm 3,10	27,09 \pm 0,00	27,09 \pm 0,00	
	QT 3% - Quantidade de CB permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm DP			
	AZ 1%	AZ 2%	AZ 3%	
1	21,97 \pm 0,00	21,97 \pm 0,00	25,54 \pm 5,51	
2	22,19 \pm 0,00	22,19 \pm 0,00	23,32 \pm 1,24	
4	22,41 \pm 0,00	22,41 \pm 0,00	25,23 \pm 0,43	
6	22,63 \pm 0,00	22,63 \pm 0,00	25,14 \pm 0,44	
8	22,85 \pm 0,00	22,85 \pm 0,00	26,73 \pm 1,47	
10	23,07 \pm 0,00	23,07 \pm 0,00	27,02 \pm 2,70	
12	23,29 \pm 0,00	23,29 \pm 0,00	27,27 \pm 0,98	
24	26,32 \pm 1,35	25,31 \pm 2,23	28,32 \pm 1,02	

TABELA 19 - Resumo dos dados estatísticos das quantidades de CB acumulado no meio receptor após 24 horas de estudo de permeação *in vitro* das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de AZ (1%, 2% e 3%).

Comparação entre as formulações	Significância ^a
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 1%	P < 0,001***
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 2%	P < 0,001***
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 2%	P > 0,05
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,05*
QT 1% + AZ 2% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,01**
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 2%	P > 0,05
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 3%	P > 0,05
QT 2% + AZ 2% X QT 2% + AZ 3%	P > 0,05
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 2%	P > 0,05
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 3%	P > 0,05
QT 3% + AZ 2% X QT 3% + AZ 3%	P > 0,05

(^a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey)

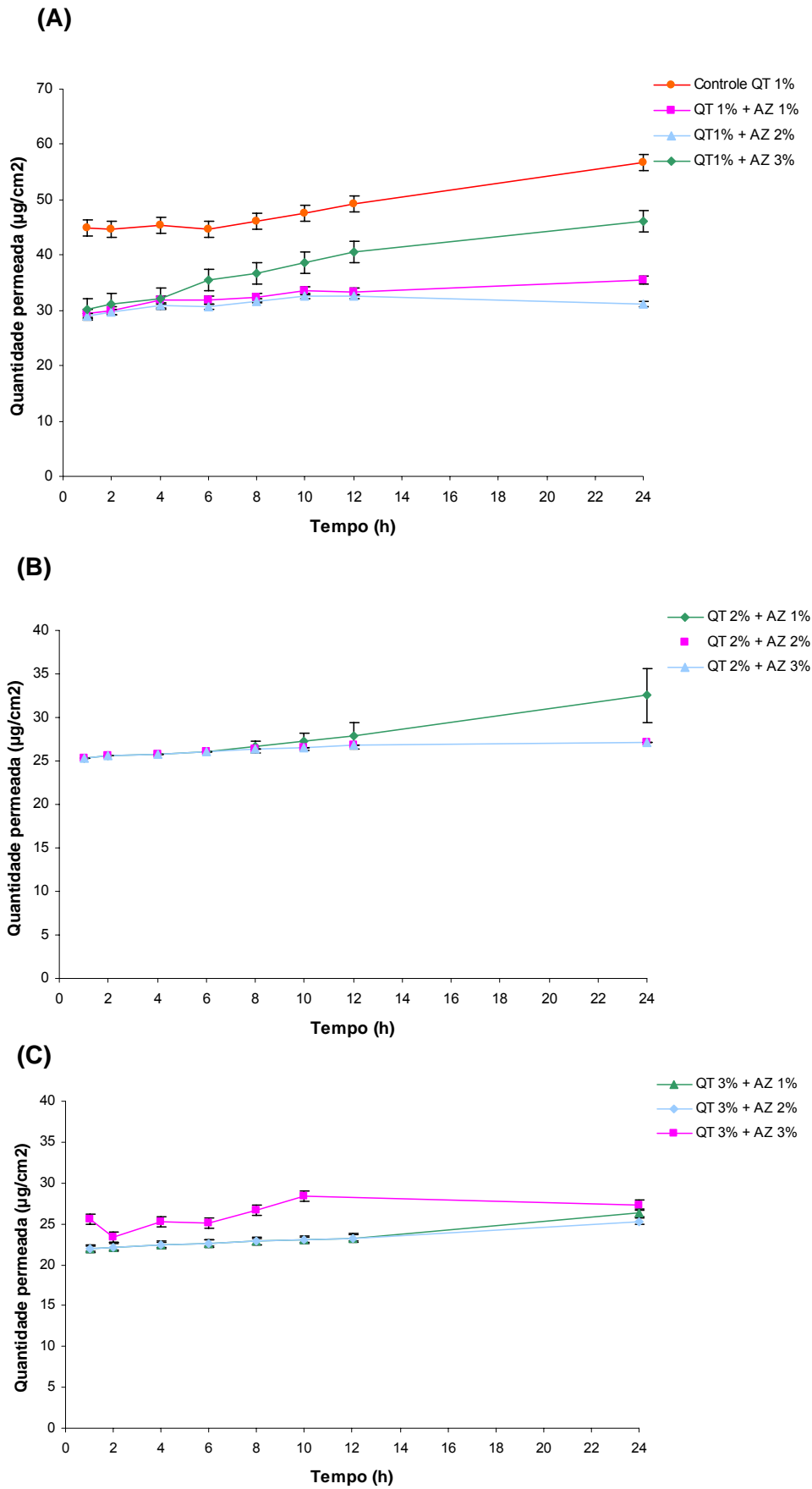


FIGURA 27 – Quantidades cumulativas de CB permeado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h) ($n = 6$) das formulações contendo QT 1% (A), 2% (B) e 3% (C) na ausência (Controle QT) e na presença do promotor de penetração AZ 1%, 2% e 3%.

4.8.2 Estudo de cinética e análise do fluxo de permeação *in vitro*

A determinação da cinética e do fluxo de permeação foi realizada de acordo com o descrito no item 4.7.2. Os valores de fluxo (J) e correlação linear (r) obtidos a partir dos estudos de cinética das formulações analisadas estão demonstrados na Tabela 20.

TABELA 20 – Determinação do fluxo e cinética de permeação das formulações das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).

Formulações	Fluxo (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$) \pm DP	Correlação linear (r)	Cinética
Controle QT 1%	0,66 \pm 0,16	0,9990	Ordem zero
QT1% + AZ 1%	0,43 \pm 0,10	0,9777	Ordem zero
QT 1% + AZ 2%	0,39 \pm 0,11	0,9982	Ordem zero
QT 1% + AZ 3%	0,87 \pm 0,12	0,9936	Ordem zero
QT 2% + AZ 1%	0,13 \pm 0,00	0,9996	Ordem zero
QT 2% + AZ 2%	0,13 \pm 0,00	1,0000	Ordem zero
QT 2% + AZ 3%	0,13 \pm 0,00	1,0000	Ordem zero
QT 3% + AZ 1%	0,11 \pm 0,00	1,0000	Ordem zero
QT 3% + AZ 2%	0,11 \pm 0,00	1,0000	Ordem zero
QT 3% + AZ 3%	0,75 \pm 0,20	1,0000	Ordem zero

A Tabela 21 representa o resumo dos dados estatísticos para os valores de fluxo obtidos a partir dos estudos de cinética de permeação para todas as formulações testadas.

TABELA 21 - Resumo dos dados estatísticos do fluxo após 24 horas de estudo de permeação *in vitro* das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).

Comparação entre as formulações	Significância ^a
	Fluxo (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$)
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 1%	P < 0,05*
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 2%	P < 0,01**
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 3%	P > 0,05
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 2%	P > 0,05
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 1% + AZ 2% X QT 1% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 2%	P > 0,05
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 3%	P > 0,05
QT 2% + AZ 2% X QT 2% + AZ 3%	P > 0,05
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 2%	P > 0,05
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 3% + AZ 2% X QT 3% + AZ 3%	P < 0,001***

(^a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey).

4.8.3 Estudos de retenção

A Tabela 22 e a Figura 28 apresentam os resultados do estudo de retenção que foi realizado após 24 horas de permeação para todas as formulações testadas. A Tabela 23 representa o resumo dos dados estatísticos dos resultados obtidos a partir dos estudos de retenção *in vitro* utilizando mucosa de bochecha suína para todas as formulações testadas.

TABELA 22 – Quantidades retidas de CB ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{DP}$) nas mucosas suínas após 24 horas de estudo de permeação ($n = 6$) das formulações de CB 2% (p/p) em QT 1%, 2% e 3% na ausência (Controle) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).

Formulações	Quantidade de CB retido ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm \text{DP}$)
Controle QT 1%	34,95 \pm 8,58
QT1% + AZ 1%	182,97 \pm 36,99
QT 1% + AZ 2%	105,04 \pm 22,91
QT 1% + AZ 3%	74,17 \pm 16,57
QT 2% + AZ 1%	36,23 \pm 10,46
QT 2% + AZ 2%	381,13 \pm 67,08
QT 2% + AZ 3%	337,04 \pm 62,56
QT 3% + AZ 1%	47,49 \pm 8,17
QT 3% + AZ 2%	441,16 \pm 79,70
QT 3% + AZ 3%	656,54 \pm 194,66

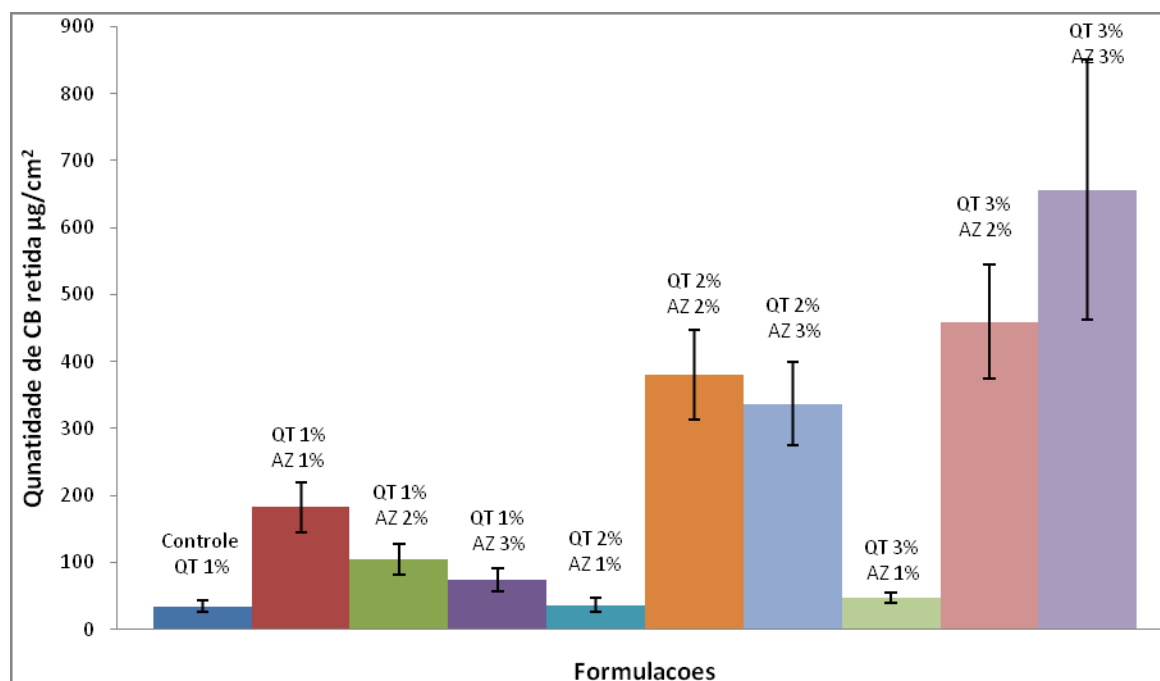


FIGURA 28 – Quantidade de CB retida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) nas mucosas suínas após 24 horas de estudo de permeação das formulações de CB 2% (p/p) em QT 1%, 2% e 3% na ausência (Controle) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).

TABELA 23 - Resumo dos dados estatísticos das quantidades retidas de CB nas mucosas suínas após 24 horas de estudo de permeação *in vitro* das formulações CB 2% (p/p) em diferentes concentrações de QT (1%, 2% e 3%) na ausência (Controle QT) e na presença de diferentes concentrações de AZ (1%, 2% e 3%).

Comparação entre as formulações	Significância ^a
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 1%	P > 0,05
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 2%	P > 0,05
Controle QT 1% X QT 1% + AZ 3%	P > 0,05
Controle QT 1% X QT 2% + AZ 1%	P > 0,05
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 2%	P > 0,05
QT 1% + AZ 1% X QT 1% + AZ 3%	P > 0,05
QT 1% + AZ 2% X QT 1% + AZ 3%	P > 0,05
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 2%	P < 0,001***
QT 2% + AZ 1% X QT 2% + AZ 3%	P < 0,01**
QT 2% + AZ 2% X QT 2% + AZ 3%	P > 0,05
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 2%	P < 0,001***
QT 3% + AZ 1% X QT 3% + AZ 3%	P < 0,001***
QT 3% + AZ 2% X QT 3% + AZ 3%	P < 0,01**

(^a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey).

5 DISCUSSÃO

A descoberta de duas isoformas da COX (COX-1 constitutiva e COX-2 induzida) permitiu uma nova oportunidade para utilização dos AINEs. O celecoxibe é um anti-inflamatório não esteroideal inibidor específico da COX-2 e está indicado para o tratamento dos sinais e sintomas da osteoartrite e artrite reumatóide, alívio da dor aguda, alívio dos sintomas de dismenorréia primária; também está indicado na redução do número de pólipos adenomatosos colorretais em poliposes adenomatosas familiares (PAF) como um adjuvante aos cuidados usuais. Diversos estudos demonstraram o efeito do celecoxibe na quimioprevenção do câncer garantindo seu futuro uso como agente quimiopreventivo (CROWELLI *et al.*, 2005; LIPPMAN, 2008).

Apesar de sua ampla comercialização no mundo, o celecoxibe ainda é de difícil aquisição por estar sob proteção patentária. Desta forma, tornou-se necessário desenvolver um método de extração do fármaco a partir de sua forma farmacêutica (cápsula) de maneira a se obter o fármaco com pureza desejada para utilização como matéria-prima no desenvolvimento das formulações propostas pelo trabalho. O procedimento de extração foi realizado através de um sistema Soxhlet, no qual o solvente é continuamente reciclado através da amostra por algumas horas. O procedimento foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa utilizou-se água como solvente a fim de retirar os excipientes hidrossolúveis presentes na formulação. O CB, devido a sua característica lipofílica, apresenta solubilidade muito baixa em água (0,007 mg/mL) e não é extraído nesta etapa. Na segunda etapa o solvente utilizado é o etanol que apresenta características mais apolares sendo, portanto capaz de solubilizar o CB (63,34 mg/mL) (SEEDHER & BHATIA, 2003). A etapa de evaporação visa a obtenção do material seco a partir da solução de CB em etanol.

O processo de extração garante a separação das substâncias hidrossolúveis daquelas lipossolúveis, mas não garante a pureza do fármaco obtido. Para retirar possíveis impurezas provenientes do processo de extração, o fármaco extraído foi então purificado através da

técnica de recristalização por solvente. O princípio que governa a recristalização é que a quantidade de soluto que pode ser dissolvido em um solvente, aumenta com a elevação da temperatura. Na recristalização a solução é preparada pela dissolução do soluto numa temperatura próxima ou igual à temperatura de ebulição do solvente. Nesta temperatura a solubilidade do soluto no solvente é aumentada consideravelmente. Desta forma, a quantidade utilizada de solvente aquecido pode ser muito menor do que a quantidade de solvente à temperatura ambiente. Quando a solução é em seguida resfriada, a solubilidade do soluto cai abruptamente e a solução se torna saturada. O soluto que não pode mais ser mantido em solução precipita na forma de cristais mais puros, que podem então ser coletados. O método de extração e purificação do fármaco demonstrou eficácia, obtendo um rendimento, em massa, de 76,8%. Além de ser um método muito simples, de baixo custo e de alta reprodutibilidade.

Para confirmarmos a eficiência do método de extração empregado, a caracterização do fármaco foi realizada através de ensaios de ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho e RMN de carbono e hidrogênio. Esses ensaios identificam a molécula e indicam a ausência de impurezas.

O ponto de fusão de uma determinada consiste na temperatura necessária para a mudança de seu estado físico de sólido para líquido. Segundo ALTON (2005), o ponto de fusão relaciona-se com o calor latente de fusão, que é a quantidade de calor gerado durante a fusão. Um cristal com ligações fracas possui um baixo ponto de fusão e um baixo calor de fusão. No caso do CB, os resultados observados para a faixa de ponto de fusão (161 a 163 °C) encontram-se próximos aos valores encontrados na literatura, 157 a 159 °C (THE MERK INDEX, 2001) indicando a identidade da substância e a ausência de impurezas.

A espectroscopia de infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção que usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético e pode ser utilizada na identificação de compostos. Baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis de energia da

molécula. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, geometria molecular, massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibracional. Na análise do espectro de infravermelho demonstrado na Figura 13, o CB pôde ser identificado principalmente pela presença de bandas bem intensas e características de deformações axiais de ligações N-H e S=O de sulfonamidas. A ligação N-H gerou duas bandas, características de sulfonamidas primárias, em 3340 e 3233 cm^{-1} . Da mesma forma, a ligação S=O originou duas bandas em 1348 e 1163 cm^{-1} . Os aromáticos também puderam ser identificados pela presença de seis bandas: uma em 3098 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C-H de aromáticos, outras duas em 2919 e 2851 cm^{-1} , geradas pela deformação axial da ligação C-H da metila ligada ao anel aromático, e as últimas três em 1914, 1801 e 1677 cm^{-1} , referentes às bandas de combinação e de harmônicas de aromáticos.

A ressonância magnética nuclear é uma técnica amplamente utilizada na determinação estrutural, uma vez que cada substância tem um espectro de RMN característico que pode ser usado como uma impressão digital da mesma. Consiste basicamente na observação de que núcleos magnéticos tais como ^1H , e ^{13}C , quando colocados em um campo magnético forte, podem absorver energia em frequências características (SILVA *et al.*, 2006). A análise dos espectros de RMN de carbono e hidrogênio (Figura 14) do CB permitiu a identificação dos átomos de carbono e hidrogênio presentes na molécula do fármaco. Os espectros de RMN C e RMN H confirmam a identificação do fármaco celecoxibe e demonstram a ausência de substâncias contaminantes, comprovando a pureza do fármaco obtido por extração e demonstrando a eficácia do processo de obtenção utilizado.

Os resultados dos ensaios de caracterização do CB confirmam a sua identificação e indicam a ausência de substâncias contaminantes, demonstrando a eficácia do processo de extração e purificação empregado.

Apesar dos estudos de caracterização indicarem ausência de impurezas, é importante determinar o teor do fármaco para que este possa ser empregado com princípio

ativo em formulações farmacêuticas. Para padronização do CB obtido, o método descrito por SAHA e colaboradores (2002) foi validado parcialmente no laboratório. O método foi reproduzível, demonstrando linearidade, seletividade e repetibilidade. A seletividade pode ser comprovada a partir da comparação dos espectros de varredura no UV da amostra e do padrão (Figura 15). A linearidade pode ser observada pelo coeficiente de correlação linear obtido ($r = 1,00$) (Figura 16), estando acima do critério mínimo aceitável pela legislação vigente. A repetibilidade (Tabela 2) pode ser demonstrada a partir dos valores de desvio padrão relativo (0,40%) dentro dos valores preconizados pela legislação (menores que 5%) (BRASIL, 2003). O teor médio encontrado de 96,6% (Tabela 2) mostrou-se adequado para o emprego do CB como matéria-prima no desenvolvimento das formulações propostas no trabalho.

O quitosano é um copolímero linear composto por unidades de 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glucopiranosose e 2-amino-2-deoxi- β -D-glicopiranosose ligadas por ligações β (1-4) (THANOU *et al.*, 2001). Devido à presença de grupos amino e hidroxil em suas unidades, o quitosano se solubiliza em soluções ácidas diluídas (SENEL *et al.*, 2000a; SANDRI *et al.*, 2004, HAUPT *et al.*, 2006) o que permite a formação de um hidrogel em água (SOKKER *et al.*, 2009).

De acordo com PEPPAS *et al.* (2000) hidrogéis são redes poliméricas hidrofílicas tridimensionais capazes de adsorver grandes quantidades de água e fluidos biológicos. A estrutura altamente porosa do hidrogel permite a incorporação de fármacos na matriz do gel e conseqüentemente a liberação do mesmo, com um fluxo dependente do seu coeficiente de difusão através da rede do gel. Certamente, as vantagens da liberação de fármacos a partir de hidrogéis são de caráter farmacocinético, especificamente pelo depósito da formulação criado a partir da lenta liberação do fármaco, mantendo uma alta concentração do mesmo nos tecidos adjacentes por longos períodos (HOARE & KOHANE, 2008).

O quitosano, sendo um polissacarídeo catiônico, contém grupos amino livres (pKa de 6,5) que em pH neutro ou básico são insolúveis em água (RAVI KUMAR *et al.*, 2000) sendo, portanto, solúvel em soluções ácidas com densidade de carga dependente do pH e do grau

de deacetilação (SUDHAKAR *et al.*, 2006). A solubilização do polímero em pH ácido ocorre devida a protonação dos grupos amino convertendo as unidades glucosaminas na forma solúvel R-NH₃⁺ (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; SOKKER *et al.*, 2009).

O aumento da concentração do polímero aumenta o número de grupamentos amino passíveis a protonação, reduzindo o número de prótons livres e consequentemente a acidez do meio. Esse fato explica o aumento dos valores de pH provocados pelo aumento da concentração do polímero observados na Tabela 4. Os valores de pH observados para os géis controle, na ausência do promotor de penetração azona, foram de 4,36; 5,09 e 5,89 para os géis contendo 1%, 2% e 3% de quitosano respectivamente. A introdução do promotor de penetração azona, assim como a variação de sua concentração na formulação não influenciaram significativamente nos valores de pH observados, ou seja, os valores de pH para as formulações contendo azona mantiveram-se na faixa observada das formulações controle descritas acima.

Os resultados obtidos a partir da avaliação do pH das formulações desenvolvidas sugerem que as formulações contendo 3% de quitosano apresentam valores de pH em torno de 5,9 mais próximos do pH bucal que se encontra na faixa de 5,8 a 7,4 (SUDHAKAR *et al.*, 2006).

O estudo das características reológicas é importante para determinação da facilidade de remoção do produto da embalagem, aplicação, espalhamento fácil e textura suave sobre o local de aplicação. Daí a importância do estudo dessas propriedades no desenvolvimento de formulações. A reologia estuda as propriedades de fluidez das substâncias ou sistemas. O estudo reológico considera a dinâmica e o movimento e por isso deve se levar em consideração as características de fluxo. Os fluxos podem ser classificados como Newtoniano e não-newtoniano de acordo com as deformações apresentadas quando o sistema é submetido à tensão. Os fluxos não-newtonianos compreendem os fluxos plástico, pseudoplástico e dilatante.

Os materiais quando submetidos a tensões, apresentam deformações características que podem ser observadas em gráficos construídos (reogramas), valores de tensão (ordenada) versus gradiente de cisalhamento (abscissa). O exame reológico de um semi-sólido pode ser representado corretamente e simplesmente por um reograma completo. A avaliação da curva de gradiente de cisalhamento (GC) x tensão de cisalhamento (TC) permite o estudo das propriedades de resistência ao fluxo, viscosidade e tixotropia. No caso dos materiais pseudoplásticos, as moléculas ou partículas dispersas estão fracamente unidas entre si. Sendo assim, quando uma ação de cisalhamento é aplicada não resistem à pressão de deslocamento, resultando em um reograma que apresenta uma curvatura característica para este tipo de material. Segundo ALTON (2005), materiais pseudoplásticos incluem dispersões coloidais aquosas de hidrocolóides naturais ou quimicamente modificados, como o quitosano. A presença de moléculas longas, de elevada massa molecular, em solução resulta no embaraçamento destes em associação com o solvente imobilizado. Sob influência de tensão, as moléculas tendem a tornar-se desembaraçadas e alinhar-se na direção do fluxo e, dessa forma, irão oferecer menos resistência ao fluxo. Esse fato, aliado à liberação de água que estará aprisionada, contribui para a diminuição da viscosidade. Em qualquer dada velocidade de cisalhamento, estabelecer-se-á um equilíbrio entre a força de cisalhamento e o reembaraçamento produzido pelo movimento browniano.

Já os materiais tixotrópicos são aqueles que quando submetidos a uma velocidade particular de cisalhamento, a sua tensão de cisalhamento e conseqüentemente, a viscosidade, irão decrescer com o tempo. Além disso, uma vez removida a tensão de cisalhamento, mesmo que a estrutura rompida seja reversível, ela pode não retornar à sua estrutura original instantaneamente. A característica comum a esses materiais é que, se forem submetidos a uma velocidade de cisalhamento gradualmente crescente, seguida, de modo imediato, por uma velocidade de cisalhamento decrescente até zero, a curva descendente estará deslocada em relação à curva ascendente, e o reograma apresenta um "loop" de histerese. No caso de materiais pseudoplásticos, a curva descendente estará

deslocada para a direita da curva ascendente. A presença do “loop” de histerese indica que ocorreu uma ruptura na estrutura, e a área dentro do “loop” pode ser usada como um índice do grau dessa ruptura. Sistemas tixotrópicos são geralmente compostos por partículas assimétricas ou macromoléculas, que são capazes de interagir mediante várias ligações secundárias produzindo uma frouxa estrutura tridimensional, de forma que o material tem um aspecto de gel quando não submetido a cisalhamento.

Não foi possível determinar o índice de fluxo e índice de consistência das formulações QT a 1% (matriz e controle), sob as condições de ensaio utilizadas devido à baixa viscosidade apresentada por essa concentração do polímero. Baseado nesses resultados as formulações QT 1% na presença de AZ não foram levadas a ensaio.

Pode-se observar que, de modo geral, o aumento da concentração do polímero aumentou o índice de consistência, a viscosidade aparente e a tixotropia em grandes proporções (Tabela 5). Podemos avaliar a influência do fármaco no comportamento reológico do gel a partir da avaliação dos parâmetros obtidos através dos reogramas. As formulações matrizes, contendo apenas o polímero QT e na ausência do fármaco CB (Figura 17) apresentaram valores de viscosidade aparente, índice de fluxo e índice de consistência maiores quando comparados com as formulações contendo o fármaco CB (Figura 18). Dessa forma, a presença do fármaco diminui a viscosidade da formulação. Em contrapartida, a diminuição dos valores de índice de fluxo implica no aumento da propriedade de pseudoplasticidade da formulação. O gel é considerado pseudoplástico quando apresenta valores de índice de fluxo menores que 1,0 e quanto menor esses valores, mais pronunciado é esse comportamento pseudoplástico. Sendo assim, as formulações contendo 3% de QT apresentaram comportamento pseudoplástico, pois apresentaram os menores valores de índice de fluxo. Os reogramas apresentados na Figura 20 caracterizam o comportamento pseudoplástico confirmando os resultados de índice de fluxo (Tabela 5).

As formulações matrizes QT 1%, 2% e 3% não apresentaram comportamento tixotrópico. A introdução do fármaco CB nas formulações levou a um aumento na tixotropia, principalmente nas formulações de maior concentração do polímero (3%), (Tabela 5). Como pode ser observada a partir da avaliação dos parâmetros obtidos, a presença do fármaco CB influenciou no comportamento reológico da formulação, diminuindo a viscosidade aparente e contribuindo para o aumento da propriedade de pseudoplasticidade e tixotropia da formulação.

Já o promotor de penetração AZ não pareceu influenciar significativamente nos parâmetros avaliados, porém o aumento de sua concentração contribuiu para o aumento dos valores de índice de consistência, viscosidade aparente e tixotropia no caso das formulações contendo 3% de QT. Estas formulações (na ausência ou na presença de AZ) apresentaram comportamento pseudoplástico e tixotrópico. Um gel pseudoplástico é capaz de se desestruturar e se reestruturar a forma original após sofrer uma tensão, o que facilita a sua remoção da embalagem. Essa característica pode ser evidenciada pelo baixo índice de fluxo encontrado para as formulações de QT 3%. A tixotropia é caracterizada quando a reorganização da malha do gel acontece de forma mais lenta. Os resultados mostram que as formulações contendo QT a 3% apresentaram valores mais altos de tixotropia. Portanto, as formulações contendo QT 3% contendo AZ 2% ou 3% além de apresentarem propriedade de pseudoplasticidade e tixotropia, apresentaram maiores valores de viscosidade aparente comparadas com todas as outras formulações. Formas farmacêuticas mais viscosas têm como vantagem um menor grau de escoamento minimizando o risco de possíveis intoxicações provenientes de deglutição acidental, representando assim uma vantagem adicional no caso de aplicação tópica bucal.

Tendo em vista os resultados obtidos a partir dos estudos de reologia das formulações, podemos eleger as formulações QT 3% contendo AZ 2% e QT 3% contendo AZ 3% como as que possuem melhores características reológicas, apresentando boa

viscosidade aparente, pseuplasticidade e tixotropia adequando-se como formulações para aplicação tópica.

O quitosano apresenta propriedades mucoadesivas devido ligações químicas secundárias como ligações de hidrogênio ou interações iônicas entre os grupos amino carregados positivamente e os resíduos de ácido siálico carregados negativamente das glicoproteínas do muco ou mucina (SUDHAKAR *et al.*, 2006). O quitosano interage com a mucina devido às forças de atração molecular de interações eletrostáticas entre as cargas positivas do quitosano e as cargas negativas da superfície da mucosa. Essas propriedades podem ser atribuídas a fortes ligações de hidrogênio a grupos como $-OH$, $-COOH$, suficiente flexibilidade da cadeia e propriedades de energia de superfície favorecendo o espalhamento sobre o muco (QAQISH & AMIJI, 1999).

No desenvolvimento de sistemas de liberação bucais um dos grandes desafios é a retenção da formulação no local de ação, visto que a saliva oral e as atividades mecânicas a removem rapidamente da superfície da mucosa bucal. O uso de polímeros adesivos, como o quitosano visa a superação desta limitação, retendo a formulação por mais tempo no local de ação e alcançando uma liberação sustentada do fármaco.

Como pode ser observado na Figura 21 e na Tabela 6, o aumento da concentração do polímero provocou um aumento na força de tensão. A média da força encontrada expressa em Newton (mN) foram de 93,33; 115 e 195 para as formulações QT 1%; QT 2% e QT 3% respectivamente. Estatisticamente, a formulação QT 1% quando comparada a formulação QT 2% não apresenta diferença significativa; ($p > 0,05$) enquanto a formulação QT 3% comparada com as outras concentrações de QT há diferença significativa ($p < 0,001$) O aumento da propriedade de mucoadesividade provocada pelo aumento da concentração do polímero pode ser elucidada pelo fato de que quanto maior a concentração de QT, maior o número de grupamentos amino carregados positivamente disponíveis para interagir com as cargas negativas da superfície da mucosa formando ligação adesivas.

Em estudo recente, PERIOLI *et al.* (2008b), testando a força de mucoadesão de géis bucais de AINEs já existentes no mercado, encontrou valores na faixa de 380 a 502 mN em mucosa de bochecha de porco. Em outro estudo, PERIOLI *et al.* (2008a), utilizando géis a base de quitosano para aplicação vaginal, encontrou valores de força de tensão na faixa de 43 a 93 mN, utilizando concentrações de 0,5 a 2% de quitosano. Nossos resultados encontram-se na faixa de valores médios entre 90 a 200 mN, utilizando concentrações de quitosano de 1 a 3%. Sendo, portanto, um valor maior do que aquele encontrado utilizando quitosano para mucosa vaginal e pouco menor comparado às formulações bucais existentes no mercado, mas ainda assim na mesma escala de força.

O ensaio de mucoadesão foi realizado na presença do promotor de penetração AZ (1%), porém a influência de sua concentração não foi avaliada. Acredita-se que essa avaliação não seja relevante já que a azona não possui propriedades de interação com a mucosa, não influenciando na força de mucoadesão. Já a interação do polímero com a mucosa é dependente da concentração, massa molecular e do grau de deacetilação do polímero. Nossos resultados comprovam que a mucoadesividade é dependente da concentração do polímero, caracterizando uma relação diretamente proporcional.

Antes do início dos estudos de liberação e permeação *in vitro*, é importante a avaliação da solução receptora a ser utilizada. Esta deve mimetizar a condição fisiológica, solução tampão pH 7,4 mantida à temperatura de 37° C e obedecer à condição *sink*. A solubilidade do fármaco deve ser maior ou igual que dez vezes a concentração máxima do fármaco alcançada no meio receptor, ou seja, no caso de 100% de liberação.

No caso de fármacos lipofílicos, o estudo de solubilidade é uma etapa crucial, já que a solubilidade desses fármacos em soluções aquosas é baixa. O CB é um fármaco de alta lipofilicidade, apresentado valores de Log P em torno de 4,00 (SOOD *et al.*, 2005) sendo, portanto, muito pouco solúvel em soluções aquosas. Nesses casos é então necessário lançar-se mão do uso da adição de tensoativos às soluções para aumentar a solubilidade desses fármacos.

Os estudos de solubilidade foram realizados adicionando excesso de fármaco a soluções aquosas de tampão fosfato pH 7,4 contendo tensoativos em diferentes concentrações. Foram testados primeiramente (Tabela 7) tween 20 (0,5%), tween 80 (0,1%), lauril sulfato de sódio (0,3%) e etanol (0,5%), obtendo valores mais altos de solubilidade para a solução contendo tween 20, mas na concentração testada ainda não se atingiu a condição *sink*, sendo, portanto testadas outras concentrações de tween 20 (1,0%), (1,5%) e (2,0%) (Tabela 8). Após os estudos de solubilidade, a solução receptora escolhida foi tween 20 (1,5%) em tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 a qual foi utilizada nos estudos de liberação e permeação *in vitro*.

Para a quantificação do CB nos estudos de liberação e permeação *in vitro* foi desenvolvida uma metodologia analítica por CLAE. No intuito de expressar o valor real das medidas quantitativas obtidas, e avaliar a eficiência do método desenvolvido se faz necessária a validação do mesmo. Um método analítico validado nos dá evidências objetivas de que o mesmo é adequado para o uso proposto. No Brasil, os procedimentos adotados baseiam-se em guias disponibilizadas por órgãos credenciadores nacionais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (INMETRO). Também podemos nos basear em guias internacionais como International Standardization for Organization (ISO), International Conference on Harmonization (ICH), ou ainda nas Diretivas da Comunidade Européia, e guias disponibilizadas pelo United States – Food and Drug Administration (US-FDA).

Os parâmetros empregados para a validação do método analítico desenvolvido incluíram seletividade, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A seletividade de um método pode ser definida como a capacidade deste em produzir respostas distintas para cada componente da amostra, ou seja, mostra a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A

seletividade pode ser comprovada pela comparação analítica entre uma matriz isenta da substância de interesse (placebo) e uma matriz adicionada de substâncias padrão, sendo que nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção da substância em estudo, ou seja, o pico cromatográfico de resposta seja exclusivamente do composto em estudo. A seletividade do método foi comprovada a partir da análise dos cromatogramas de injeção da formulação placebo e do padrão de CB (Figura 22), demonstrando a ausência de interferência dos componentes da matriz. Além disso, os gráficos de pureza de pico, e o espectro de varredura (Figura 23) também comprovam a seletividade do método.

A capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse é definida como linearidade. Essa relação de proporcionalidade é expressa pela curva analítica, na qual parâmetros estatísticos, como coeficiente de correlação linear (r), obtido a partir da regressão linear da curva, são avaliados a fim de assegurar sua qualidade. A RE n° 899 (ANVISA, 2003) e o ICH assumem como critério mínimo de aceitação para comprovação de linearidade valores maiores que 0,99 e 0,999 respectivamente de coeficiente de correlação linear. A linearidade do método foi comprovada face aos valores de inclinação significativos e aos valores de coeficiente de correlação linear superiores a 0,999 (Figura 24 e Tabela 9).

A dispersão dos resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra representa a precisão do método. Para processos de validação, a precisão é considerada em três níveis distintos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, quais sejam, mesmo local, procedimento, analista, instrumento e repetições efetuadas em curto intervalo de tempo. A avaliação do efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, ou diferentes analistas, ou diferentes equipamentos, ou uma combinação destes fatores é medida pela chamada precisão intermediária. Tanto a repetibilidade como a precisão intermediária são expressas por meio

da estimativa do desvio padrão relativo (DPR). A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas em diferentes laboratórios, portanto sob condições variadas, tais como diferentes operadores, local, equipamentos, entre outros.

A precisão do método cromatográfico foi avaliada quanto à repetibilidade (mesmo dia) e precisão intermediária (dias diferentes). Os resultados obtidos (Tabela 10), mostram valores de DPR menores que 2% para todas as concentrações de CB analisadas, revelando uma adequada repetibilidade (DPR intra-dia) e precisão intermediária (DPR inter-dias) do método, mostrando-se dentro do valor recomendado pela legislação vigente, ou seja, valores de DPR abaixo de 5% (ANVISA, 2003).

Além disso, a precisão de injeção do equipamento também foi avaliada. A precisão de injeção do cromatógrafo pode ser demonstrada quando os valores de DPR encontrados forem menores que 2%. Como pode ser observado na Tabela 11, a dispersão dos resultados de injeções da concentração de trabalho (10 µg/mL) apresentou valores de desvio padrão relativo de 0,62% sendo, portanto considerado satisfatório.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para este fim envolvem o uso de substâncias químicas de referência (SQR), comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão. Utilizamos o método de recuperação, onde quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis ao branco da matriz, sem a substância de interesse. A recuperação é avaliada por meio da proporção da quantidade da substância de interesse que é extraída e quantificada em relação à quantidade adicionada. Os resultados do ensaio de recuperação, para os três níveis de concentração analisados 80%, 100% e 120% apresentaram valores de 99,75%; 100,18%; e 101,32 % respectivamente (Tabela 12), permanecendo dentro da faixa de 98 a 102%, considerada aceitável para o intervalo

avaliado (AOAC, 2000 apud BARROS & HIRATA, 2004) e evidenciando a adequada exatidão do método para a determinação do celecoxibe na formulação estudada.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do composto de interesse que o método analítico é capaz de detectar, mas não necessariamente quantificar. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração que o método analítico é capaz de quantificar com precisão e exatidão. Podem ser calculados pela relação sinal-ruído ou a partir dos parâmetros da curva analítica. Os valores de LD e LQ obtidos a partir dos parâmetros da curva foram de 0,04 µg/mL e 0,12 µg/mL respectivamente (Tabela 13). A determinação dos valores de LD e LQ tem importância crucial no desenvolvimento do método em questão, já que este se propõe a quantificar o CB nos estudos de liberação e permeação e nas primeiras horas do estudo a concentração encontrada é baixa. Tendo isso em vista, os valores de LD e LQ encontrados encontram-se satisfatórios para o fim pretendido.

A validação da metodologia analítica desenvolvida comprovou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e sensibilidade demonstrando ser adequada para a utilização na quantificação do fármaco CB na formulação e nos estudos de liberação e de permeabilidade *in vitro*.

Os estudos de liberação *in vitro* visam à avaliação da liberação/cedência do fármaco a partir da formulação desenvolvida. Os estudos de liberação revelaram uma cinética de pseudo-primeira ordem para a formulação controle em etanol (Controle EtOH, na ausência de QT) e uma cinética de ordem zero para todas as formulações contendo QT em diferentes concentrações 1%, 2% e 3%, tanto na ausência (Controle QT) quanto na presença (1%, 2% e 3%) do promotor de penetração AZ (Figura 25). As formas farmacêuticas que seguem perfil de ordem zero liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, constituindo-se como uma das melhores formas de veicular fármacos para liberação prolongada. Analisando o perfil de liberação das formulações controle pode-se observar que na ausência do polímero houve uma maior quantidade de fármaco liberado

de forma imediata ($2263,78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Na presença de QT, a liberação de CB ocorre de forma lenta, caracterizando um sistema de liberação prolongada.

O aumento da concentração de QT na formulação leva a uma diminuição da quantidade de CB liberada e dos valores de fluxo após 24 horas (Tabela 14). Dentre as formulações de QT controle, obtivemos maior quantidade de CB liberada ($883,05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e maiores valores de fluxo ($34,99 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$) para a formulação Controle QT a 1%. Estatisticamente, tanto a quantidade de CB liberada quanto os valores de fluxo das formulações Controle QT 1% comparados ao Controle QT 2% e Controle 3% apresentam diferenças significativas ($p < 0,001$). Já entre as formulações Controle QT 2% e Controle 3% não houve diferença estatística significativa.

A influência da concentração de AZ para cada concentração de QT também foi avaliada (Tabela 16). Como pode ser observado na Figura 26 (A) para as formulações contendo QT a 1%, o aumento da concentração de AZ, estabeleceu uma relação inversamente proporcional à liberação, provocando uma diminuição da liberação do CB a partir da formulação. Dentre estas formulações, todas apresentaram diferença estatística significativa entre si em todos os tempos testados.

Já no caso das formulações contendo QT a 2%, como pode ser observada na Figura 26 (B), a quantidade de CB liberada da formulação contendo AZ 1% superou a liberação do Controle QT 2%, seguidas das formulações contendo AZ 2% e AZ 3%. O fluxo de liberação *in vitro* após 24 horas de estudo, foi significativamente diferente para o controle QT 2% somente em relação a formulação contendo AZ 1%. Entre as formulações contendo AZ 2% e AZ 3% não houve diferença estatística entre os fluxos.

Como pôde ser observado na Figura 26 (C), para as formulações contendo QT a 3%, o aumento da concentração de AZ estabeleceu uma relação inversamente proporcional à liberação. Estatisticamente, a análise do fluxo de liberação mostrou que a formulação controle QT 3% apresentou diferença significativa em relação às formulações contendo AZ 2% e 3%. O fluxo da formulação contendo AZ 1% foi significativamente diferente em relação

as formulações contendo AZ 2% e AZ 3%, já entre essas últimas não houve diferença significativa.

Em resumo, o aumento da concentração do polímero provocou uma diminuição do fluxo de liberação e conseqüentemente, por se tratar de uma cinética de ordem zero, que libera a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, uma diminuição na quantidade de fármaco liberada. Esse fenômeno pode ser explicado pelo aumento da complexidade da malha do gel na presença de maiores concentrações do polímero, diminuindo a cedência do fármaco a partir da formulação.

A influência do promotor de penetração AZ nas concentrações 1, 2 e 3% também foi avaliada para cada concentração de QT nos valores de fluxo de liberação e quantidade de CB liberada. Pode-se considerar, de maneira geral, que a introdução de AZ provocou uma diminuição nos valores de fluxo e na quantidade de CB liberada, como se observa a partir da comparação das formulações Controle QT (na ausência de AZ) com as formulações contendo AZ para todas as concentrações de QT.

Como já citado anteriormente, a presença do polímero QT levou a obtenção de uma cinética de liberação de ordem zero. Essa cinética foi mantida com a variação da concentração de QT assim como com a presença e variação do promotor de penetração AZ. As diferentes concentrações de QT e AZ não influenciaram no modelo cinético de liberação observado nos estudos *in vitro*, porém exerceram influência nos valores de fluxo (J) de liberação e conseqüentemente na quantidade de CB liberada. A partir de todos os resultados obtidos nos estudos de liberação *in vitro*, podemos inferir que as formulações contendo QT 2% e 3% adicionadas de AZ 2% e 3% obtiveram menores valores de fluxo comparadas a seus respectivos controles, ou seja, liberam o fármaco de forma mais lenta, caracterizando um sistema de liberação prolongada. É interessante notar que dentre todas as formulações, a que apresentou menor fluxo de liberação foi QT 1% contendo AZ 3% ($4,87 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Porém, as formulações de QT 1% não apresentaram propriedades reológicas e mucoadesivas ideais para aplicação tópica, o que nos levou à escolha das formulações

QT 2% e 3% contendo AZ 2% e 3% como as mais adequadas ao objetivo proposto, até o momento. A fim de avaliar se estas formulações são efetivamente promissoras para a veiculação bucal do CB em termos de proporcionar maior retenção deste no local de aplicação, bem como menor permeação através da mucosa, os estudos de permeação e retenção *in vitro* foram realizados posteriormente.

Segundo MILLER *et al.* (2005) formas farmacêuticas semi-sólidas como os géis, têm como vantagem a facilidade de dispersão sobre a mucosa. Os hidrogéis, por exemplo, são formas promissoras para liberação bucal de fármacos. São formados de polímeros que são hidratados em ambiente aquoso e podem incorporar fármacos fisicamente e liberá-los de forma lenta por difusão ou erosão. A aplicação de géis biodesivos prevê a retenção da formulação na cavidade oral por mais tempo levando a uma adequada penetração do fármaco, aumento a eficácia e adesão ao tratamento. Já foram desenvolvidos alguns sistemas de liberação de fármacos utilizando o quitosano como polímero mucoadesivo para aplicação oral (KINCI, *et al.*, 2002; SENEL *et al.*, 2000b; SENEL *et al.*, 2001; MARTIN *et al.*, 2003).

Sabe-se que a permeação de fármacos pela via bucal ocorre por duas rotas principais, a transcelular e a paracelular. Geralmente, para a maioria dos fármacos, a permeação através do epitélio bucal acontece através da rota paracelular por difusão passiva. A alta lipofilicidade do celecoxibe pode limitar a sua penetração no epitélio da mucosa bucal prejudicando assim sua retenção neste local, seu alvo para exercer efeito quimiopreventivo no câncer de mucosa oral. Desse modo, para superar esta limitação deve-se promover a penetração do fármaco no tecido. Já foi demonstrada a capacidade da azona em aumentar a retenção tecidual de fármacos lipofílicos na mucosa bucal, sugerindo sua utilização na terapia local como promotor de permeação de fármacos.

A permeação do CB -a partir das formulações propostas- através da mucosa oral de bochecha de porco, bem como a sua retenção neste tecido foram avaliadas pelos estudos de permabilidade *in vitro*.

Os resultados de permeação *in vitro* demonstraram que o aumento da concentração de QT, diminui a quantidade de CB permeado através a mucosa (Tabela 18) bem como o fluxo (J) de permeação (Tabela 20). Isto está de acordo com os resultados obtidos nos estudos de liberação *in vitro*. Ou seja, o aumento da concentração de QT aumenta a viscosidade das formulações, diminuindo a quantidade liberada de CB e conseqüentemente, a quantidade permeada do fármaco.

No caso das formulações contendo QT a 1% (Figura 27 A) a quantidade de CB permeado foi maior para a formulação controle. Ou seja, a inclusão do promotor de penetração AZ diminuiu a permeação do fármaco (em torno de 1,5 vezes) novamente devido ao aumento crescente da viscosidade das formulações. A análise estatística dos fluxos das permeações (J) demonstra que a formulação Controle QT 1% é estatisticamente diferente em relação àquelas contendo AZ 1% e AZ 2%.

Já no caso das formulações de QT 2% (Figura 27 B), o aumento da concentração de AZ também diminui a quantidade permeada do fármaco através da mucosa após 24 horas. Porém, a análise estatística demonstra que as formulações de QT 2% contendo AZ em diferentes concentrações não apresentaram fluxos (J) estatisticamente diferentes quando comparadas entre si.

O mesmo foi observado para as formulações contendo QT 3% na presença de diferentes concentrações de AZ em relação aos valores de quantidade permeada do fármaco através da mucosa após 24 horas (Figura 27 C). Neste caso, a análise estatística do fluxo de permeação (J) demonstra que a formulação de QT 3% contendo AZ 3% é estatisticamente diferente em relação às formulações contendo AZ 1% e AZ 2%.

Resumindo, as formulações de QT 2% e 3% apresentaram menores valores de CB permeado comparadas às formulações de QT 1%. No geral, os fluxos de permeação de todas as formulações e controles testados (Tabela 20) são considerados baixos, ou seja, estão de acordo com as quantidades de CB permeado (Tabela 18). Porém os menores fluxos foram encontrados para as formulações contendo 2% e 3% de QT.

O uso da Azona como promotor de penetração de fármacos na mucosa oral na terapia local já foi sugerido em estudos anteriores (NICOLAZZO *et al*, 2005a; 2005b). Um dos mecanismos do efeito promotor da Azona descrito na literatura é devido ao aumento da captação do fármaco na mucosa bucal. Através do aumento da solubilidade do fármaco na mucosa, um aumento na permeabilidade bucal é esperado de acordo a primeira Lei de difusão de Fick. Em outras palavras, a Azona pode promover a permeabilidade de certos compostos através do aumento da partição desses compostos para a mucosa bucal aumentando a retenção tecidual de fármacos neste local, sugerindo sua utilização na terapia tópica como promotor de permeação de fármacos. (NICOLAZZO *et al*, 2005c).

Desse modo, os estudos de retenção do CB na mucosa de bochecha suína foram realizados após o término dos estudos de permeação *in vitro*. Os resultados da análise de retenção do fármaco (Tabela 22 e Figura 28) mostram que para as formulações contendo QT 1%, a introdução do promotor de penetração AZ (1%) na formulação aumenta a retenção tecidual do fármaco após 24 horas de estudo (182,97 µg). Porém, o aumento da concentração de AZ (2% e 3%) não aumentou proporcionalmente a quantidade de CB retida. Após a análise estatística (Tabela 23) observamos que entre as formulações contendo QT 1% não houve diferença significativa. Podemos concluir então, que a AZ não exerceu influência na retenção tecidual de CB no caso das formulações contendo QT 1%. Já no caso das formulações contendo QT 2% e QT 3% a presença de AZ em diferentes concentrações mostrou-se extremamente influente, aumentando a retenção tecidual com o aumento da concentração de AZ. Além disso, o aumento da concentração de QT associado ao aumento da concentração de AZ proporcionou aumentos ainda maiores nos valores de retenção tecidual, indicando um efeito sinérgico de promoção da penetração do fármaco. Assim, a maior retenção tecidual foi observada para a formulação de QT 3% contendo AZ 3% (625,54 µg).

Concluindo, os estudos de permeabilidade *in vitro* demonstraram baixa permeação através da mucosa e alta retenção tecidual do fármaco, caracterizando um sistema de

liberação tópica com baixa absorção sistêmica, ideal para a aplicação do CB na mucosa oral. A capacidade da azona em aumentar a retenção tecidual de fármacos lipofílicos na mucosa bucal, sugerindo sua utilização na terapia local como promotor de permeação de fármacos já foi demonstrada anteriormente (NICOLAZZO *et al.*, 2005b). O presente estudo comprova essa capacidade, já os resultados demonstram um ganho em retenção tecidual dependente da concentração de azona na formulação.

A ação do quitosano como promotor de absorção na mucosa oral já foi descrita demonstrando causar efeito relativamente leve e reversível na morfologia epitelial da mucosa (DODANE, *et al.*, 1999). Uma das explicações para o efeito promotor observado pode ser devido à natureza bioadesiva do quitosano, que aumenta a retenção do fármaco no local de aplicação. SANDRI e colaboradores (2005a) demonstraram que a interação entre o polímero e a mucina, responsável pela formação da ligação mucoadesiva está envolvida com o mecanismo de promoção de penetração. A interpenetração do polímero e mucina provavelmente enfraquece a barreira epitelial, desfazendo parcialmente a estrutura da matriz extracelular e ligações intercelulares. Além disso, o quitosano também pode agir na organização da camada intercelular lipídica que forma a barreira do epitélio oral, refletindo em um efeito permeabilizante direto (SENEL *et al.*, 2001). Sendo assim, o efeito promotor do quitosano ocorre tanto pela ação direta na desorganização da barreira lipídica do epitélio oral, como pela sua propriedade mucoadesiva que promove o aumento da retenção da formulação na superfície da mucosa. Isso constitui uma vantagem clínica, já que a eliminação da formulação pelo fluxo salivar pode ser reduzida (NICOLAZZO *et al.*, 2005b).

Visto que os estudos de mucoadesão demonstraram maiores forças de tensão para as formulações contendo QT 3%, e os maiores valores de retenção tecidual também foram observados para essas formulações, podemos estabelecer uma relação entre a força de mucoadesão e o efeito promotor de penetração do quitosano. Além disso, os valores mais altos de retenção tecidual observados para as formulações contendo maiores concentrações de AZ e QT sugerem um efeito sinérgico de promoção de penetração do fármaco na

mucosa oral a partir dos efeitos do promotor de AZ e do polímero mucoadesivo QT, observados nos estudos de retenção tecidual.

Assim, os resultados globais mostraram que as formulações de QT 3% contendo AZ 2% e AZ 3% podem ser potencialmente utilizadas como sistemas de liberação para o fármaco CB, proporcionando uma liberação sustentada e adequadas propriedades reológicas e mucoadesivas. Além disso, o sistema foi caracterizado como tópico (alta retenção na mucosa e baixa permeação do CB através desta) podendo ser utilizado no tratamento quimiopreventivo do câncer oral sem causar efeitos adversos oriundos da absorção sistêmica do celecoxibe.

6 CONCLUSÕES

- O método de extração e purificação do fármaco celecoxibe se mostrou eficaz permitindo sua obtenção com bom rendimento através do uso de metodologia simples, de baixo custo e de alta reprodutibilidade. A caracterização físico-química e espectroscópica do CB obtido confirmou sua identificação e indicou a ausência de substâncias contaminantes, demonstrando a eficácia do processo de extração e purificação empregado. O teor médio encontrado de 96,6 % mostrou-se adequado para o emprego do CB como matéria-prima no desenvolvimento das formulações propostas no trabalho;
- Os resultados obtidos a partir da avaliação do pH das formulações desenvolvidas no trabalho sugerem que os géis contendo 3% de quitosano apresentam valores de pH em torno de 5,9 mais próximos do pH bucal que se encontra na faixa de 5,8 a 7,4 (SUDHAKAR et. al, 2006);
- Tendo em vista os resultados obtidos a partir dos estudos de reologia das formulações, podemos eleger as formulações QT 3% contendo AZ 2% e AZ 3% como as que possuem melhores características reológicas, apresentando boa viscosidade aparente, pseuplasticidade e tixotropia adequando-se como formulações para aplicação tópica;
- Nossos resultados comprovam que a mucoadesividade é dependente da concentração do polímero QT, caracterizando uma relação diretamente proporcional e que se encontra na mesma escala de força que as formulações tópicas bucais existentes no mercado;
- A validação da metodologia analítica desenvolvida comprovou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e sensibilidade demonstrando ser adequada para a

utilização na quantificação do fármaco CB na formulação e nos estudos de liberação e permeabilidade *in vitro*;

- A presença do polímero QT levou a obtenção de uma cinética de liberação de ordem zero. Essa cinética foi mantida com a variação da concentração de QT assim como com a presença e variação do promotor de penetração AZ. As diferentes concentrações de QT e AZ não influenciaram na cinética de liberação observada nos estudos *in vitro*, porém exerceram influência nos valores de fluxo de liberação e conseqüentemente na quantidade de CB liberada. A partir de todos os resultados obtidos nos estudos de liberação *in vitro*, podemos inferir que as formulações de QT 2% e 3% contendo AZ 2% e 3% obtiveram menores valores de fluxo, ou seja, liberam o fármaco de forma mais lenta, caracterizando um sistema de liberação prolongada com comodidade posológica;
- Os estudos de permeabilidade *in vitro* demonstraram baixa permeação através da mucosa e alta retenção tecidual do fármaco, caracterizando um sistema de liberação tópico com baixa absorção sistêmica. O aumento da concentração de QT (3%) e AZ (2% e 3%) levaram ao aumento da retenção tecidual sugerindo a promoção de um efeito sinérgico de promoção de penetração do fármaco na mucosa oral a partir dos efeitos do promotor de penetração AZ e do polímero mucoadesivo QT;
- As formulações de QT 3% contendo AZ 2% e AZ 3% foram, portanto escolhidas como potenciais sistemas de liberação do fármaco CB, proporcionando uma liberação controlada, alta retenção tecidual e baixa permeação através da mucosa, adequado pH, além de adequadas propriedades reológicas e mucoadesivas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI S.A., MALLIKARJUNA N.N., AMINABHAVI T.M., Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, **J. Control. Release** vol 100, p. 5–28, 2004.

AHNEN D.J. Colon cancer prevention by NSAIDs: what is the mechanism of action? **Eur J Surg, Suppl.** vol 582, p.111– 114, 1998.

AKITA Y., Cyclooxygenase-2 is a possible target of treatment approach in conjunction with photodynamic therapy for various disorders in skin and oral cavity, **British J. Dermatol.** vol 151 p. 472-480, 2004.

AKSUNGUR P., SUNGUR A., UNA S., ISKIT A.B., Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies, **J. Contrl. Realese.** vol 98 p. 269-279, 2004.

ALTON M.E., **Delineamento de formas farmacêuticas**, Editora Artmed, 2ª edição, Porto Alegre, RS p.504, 2005.

ANVISA, Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>

ARAUJO L.F., SOEIRO A.M., FERNADES J.L. and JUNIOR C.V.S., Eventos cardiovasculares: Um efeito de classe dos inibidores de COX-2, **Instituto do Coração do H. Clínicas-FMUSP-São Paulo**, SP, 2005.

AYALASOMAYAJULA S.P. and KOMPELLA U.B., Subconjunctivally administred celecoxib-PLGA microparticles sustain retinal drug levels and alleviate diabetes-induced oxidative stress in rat model, **Eur. J. Pharm.** vol 511 p.191-198, 2005.

BARROS, C.B.; HIRATA, Y.S. **Princípios e práticas de validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: Schaffer empreendimentos S/C, p.23-24, 2004.

BARNES M.N., CHIENG D.F., DREHER M., JONES J.L., Feasibility of performing chemoprevention trials in women at elevated risk of ovarian carcinoma: Initial examination of celecoxibe as chemopreventive agent, **Gynecologic Oncology.** vol 98 p. 376-382, 2005.

CELEBRA®, celecoxibe, São Paulo: Laboratórios Pfizer LTDA, 1998.

CHAN G., BOYLE J.O., YANG E.K., ZHANG F., Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck, **Cancer Res.** vol 59, p. 991–994, 1999.

CHUM K.S. and SURH Y.J., Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention, **Biochemical Pharmacology**, vol 68, p.1089-1100, 2004.

CROWELLI J. A., The chemopreventive agent development research program in the Division of Cancer Prevention of the US National Cancer Institute: An overview, **European Journal of Cancer** vol 41 p.1889–1910, 2005.

DODADE V. and VILIVALAM V.D., Pharmaceultical applications of chitosan, **PSTT** vol. 1, n° 6 September 1998.

DODANE V., AMIN KHAN M. and MERWIN J. R., Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **Int. J. Pharm.** vol 182 p. 21-32,1999.

EROGLU M., IRMAK S., ACAR A. and DENKBAS E.B., Desing and Evaluation of mucoadhesive therapeutioc agent delivery system for postoperative chemotherapy in superficial bladder cancer, **Int. J. Pharm.** vol 235 p. 51-59, 2002.

FITZPATRICK, F.A.; SOBERMAN, R.; Regulated Formation of Eicosanoids. **Journal of Clinical Investigation**, vol.107, p.1347–1351, 2001.

GOODMAN & GILMAN, **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10° edição, Março 2003.

HAIL N.J., CORTES M., DRAKE E.N. and SPALHOLZ J.E.; Câncer chemoprevention: a radical perspective, **Free Radical Biology & Medicine**, vol 45 p. 97-110. 2008.

HANG H.P., DALE M.M., RITTER, J.M., **Farmacologia**: 4ª Edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.189, 1999.

HARRIS D., ROBINSON, J.R., Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity, **J. Pharm. Sci.** vol 81, p. 1–10, 1992.

HARRIS R.E., BEEBE-DONK J., ALSHAFIE G.A., Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **BMC Cancer**. 2006 Jan 30;6:27.

HAUPT S., ZIONI T., GATI I., KLEISTERN J. and RUBINTEIN A., luminal delivery and dosing considerations of local celecoxib administration to colorectal cancer, **Eur. J. Pharm. Sci.** Vol 28 p.204-211, 2006.

HOARE T.R. and KOHANE D.S., Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, **Polymer**, vol 49 p.1993-2007, 2008.

HUANG Y., LEOBANDUNG W., FOSS A. and PEPPAS N.A., Molecular aspects of muco- and biodhesion: Tethered structures and site-specific surfaces, **J. Control. Realease**. vol 65 p.63-71, 2000.

ICH, Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 2005

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, Falando sobre o câncer de Boca, **Ministério da Saúde**, 2002.

KINCI G.I., SENEL S., AKVNCVBAY H., Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*, **Int. J. Pharm.** vol 235 p. 21-127, 2002.

KISMET K., AKAY M.T., ABBASOGLU O. and ERCAN A., Celecoxibe: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevetion, **Cancer Detection and Prevention.** vol 28 p. 127-142, 2004.

KURIAKOSE M. A, SHARAN R., Oral Cancer Prevention, **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am** vol 18 p. 493–511, 2006.

JAUHARI S., A mucoadhesive in situ gel delivery system for paclitaxel, **AAPS PharmSciTech.** 2006 Jun 2;7(2):E53.

JUNGINGER H.E., HOOGSTRAATE J.A. and VERHOEF J.C., Recent advances in buccal drug delivery and absorption- in vitro and in vivo studies, **J. Control. Realease.** vol 62 p.149-159,1999.

LANGOTH N., KALBE J. and SCHNURCH A.B., Development of a mucoadhesive and permeation enhancing buccal delivery system for PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), **Int. J. Pharm.** vol 296 p.103-111, 2005.

LI N., SOOD S., WANG S., Overexpression of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase in hamster and human oral cancer and chemopreventive effects of celecoxib and zileuton, **Clin Cancer Res** vol 11 p. 2083–8, 2005.

LIPPMAN S.M., The Future of Molecular-Targeted Cancer Chemoprevention, **Gastroenterology** vol 135, p. 1834-1841, 2008.

LIU X.H., YAO S., KIRSCHENBAUM A., NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates Bcl-2 expression in LNCaP cells. **Cancer Res.** vol 58 p. 4245–9, 1998

LÓPEZ C.R., PORTERO A., VILA-JATO J.L. and ALONSO M.J., Design and Evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayerde devices for bucall drug delivery, **J. Control. Release.** vol 55 p. 143-152, 1998.

LÓPEZ A., LLINARES F., CORTELLC. and HERÁEZ M., Comparative enhancer effects osf Span[®] with Tween[®] 20 and Azone[®] on the in vitro percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities, **Int. J. Pharm.** Vol 202 p. 133-140, 2000.

MAGNE B., JAN S., ARI S., ALBRECHT R., JON S., Cyclooxygenase- 2 expression as related to a genetic risk marker of oral cancer, **Tumor Biol.** 23 (Suppl. 1) 29, 2002.

MARTIN L., WILSON C.G., KOOSHA F., Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** vol 55 p. 35– 45, 2003.

MATHIAS C., COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib prevent oxidative DNA fragmentation, **Anticancer Res.**, 26 (3A) p. 2003-7, 2006 May-Jun.

MÉRIC J.B., ROTTEY S., OLAUSSEN K., SORIA J.C., KHAYAT D., Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development, **Critical reviews in Oncology/Hematology**. vol 59 p. 51-64, 2006.

MILLER N. S., CHITTCHANG M., JOHNSTON T.P., The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery, **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol 57 p.1666 -1691, 2005.

NICOLAZZO J.A., REED B. L., FINNIN B.C., Modification of buccal drug delivery following pretreatment with skin penetration enhancers, **J. Pharm Sci**. vol 93 p. 2054-2063, 2004.

NICOLAZZO J.A., REED B. L., FINNIN B.C ,Enhancing the buccal mucosal uptake and retention of triamcinolone acetonide, **J. Control. Release**. vol 105 p. 240-248, 2005 ^a.

NICOLAZZO J.A., REED B. L., FINNIN B.C.,Enhanced buccal mucosal retention and reduced buccal permeability of estradiol in the presence of padimate O and Azone ®: A mechanistic study, **J. Pharm Sci**. vol 94 p. 873-882, 2005 ^b.

NICOLAZZO J. A., REED B. L., FINNIN B. C., Buccal penetration enhancers - How do they really work? **Journal of Controlled Release**, vol 105 p. 1-15, 2005^c.

NISHIMURA, G.,YANOMA, S., MIZUNO, H., KAWAKAMI, K., TSUKUDA, M. A, Selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppress tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinoma cells, **Jpn. J. Cancer Res**. Vol. 90, p. 1152–1162, 1999.

OBARA K., ISHIHARA M., OZEKI Y., ISHIZUKA T., Controlled release of paclitaxel from photocrosslinked chitosan hydrogels and its subsequent effect on subcutaneous tumor growth in mice, **J. Control. Release**. vol 110 p.79-89, 2005.

OSHIMA, M., DINCHUK, J.E., KARGMAN, S. L., OSHIMA, H. Suppression of intestinal polyposis in Apc D716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX2), **Cell**, vol 87, p. 803–809, 1996.

PAPADIMITRAKOPOULOU V., HON W.K. Retinoids in head and neck chemoprevention, **Proc. Soc. Exp. Biol. Med**. vol 216, p. 283–290, 1997.

PEDRAZZI V., Sistemas bioadesivos intrabucais para a liberação programada de fármacos: avaliação da resistência à remoção de um dispositivo acrílico e outro polimérico, **Tese de doutorado**. Riberão Preto-USP 1999.

PEPPAS N.A., BURES P., LEOBANDUNG W., Hydrogels in pharmaceutical formulations, **Eur. J. Pharm. Biopharm**. vol 50 p. 27–46, 2000.

PERIOLI L., AMBROBI V., VENEZIA L., Chitosan and modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** vol 66, p. 141 -145, 2008 ^a.

PERIOLI L., PAGANO C., MAZZITELLI S., Rheological and functional characterization of new antiinflammatory delivery systems designed for buccal administration, *International Journal of Pharmaceutics* vol 356, p.18 - 28, 2008^b.

QAQISH R. B. and AMIJI M. M, Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interactions. **Carbohydr. Polym.** vol 38 p.99-107, 1999.

QUINTANAR A.G., KALIA Y.N., RIEG F.F. and BURI P., Mechanisms of oral permeation enhancement, **Int. J. Pharm.** vol 156 p. 127-142, 1997.

RAVI KUMAR M. N. V., A review of chitin and chitosan applications. **React. Funct. Polym.** vol 46 p. 1-27, 2000

REDDY B.S., HIROSE Y., LUBET R., Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. **Cancer Res.** vol 60 p. 293–297, 2000.

SAHA R.N., SAJEEV C., JADHAV P.R., Determination of celecoxib in pharmaceutical formulations using UV spectrophotometry and liquid chromatography, **J. Pharmaceut. Biomed.** vol 28 p. 741–751, 2002

SANDRI G., ROSSI S., FERRARI F., BOMFERONI M.C., Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers, **Eur. J. Pharm. Sciences.** vol 21 p. 351-359, 2004.

SANDRI G., ROSSI S., BONFERONI M.C., Buccal penetration enhancement properties of *N*-trimethyl chitosan: Influence of quaternization degree on absorption of a high molecular weight molecule, **Int. J.Pharm.** vol 297, p. 146–155, 2005.

SAWAKOA H., KAWANO S., TSUJI S., Cyclooxygenase-2 inhibitor suppress the growth of gastric cancer xenografts *via* induction of apoptosis in nude mice, **Am. J. Physiol.** vol 274 p. 061–7, 1998a.

SAWAKOA H., KAWANO S., TSUJII M., MURATA H., HORI M., Effects of NSAIDs on proliferation of gastric cancer *in vitro*: possible implication of cyclooxygenase-2 in cancer development. **J Clin Gastroenterol** ; vol 27 p. 47– 52, 1998b.

SCHIPPER N.G.M., VARUM K.M., STENBERG P., OCKLIND G., Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs 3: Influence of mucus on absorption enhancement, **E. J. Pharm. Sci.** vol 8 p. 335-343, 1999.

SCHOLZ O. A., WOLFF A., SCHUMACHER A., Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device, **Drug Discovery Today**, vol 13, p. 247-253, 2008.

SHENG H., SHAO J., MORROW J.D., Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells, **Cancer Res** vol 58 p. 362–6, 1998.

SEEDHER N. and BHATIA S., Solubility Enhancement of Cox-2 Inhibitors Using Various Solvent Systems, **AAPS PharmSciTech**, vol 4 Article 33, 2003.

SENEL S., I:KINCI G., KAS S., Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery, **Int. J. Pharm.** vol 193, p. 197–203, 2000a.

SENEL S., KREMER M.J., KAS S., Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa, **Biomaterials** vol 21 p. 2067– 2071, 2000b.

SENEL S., HINCAL A.A., Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations **Journal of Controlled Release**, vol 72 p. 133–144, 2001.

SIECZKA E., DATTA R., SINGH A., Cancer of the Buccal Mucosa: are Margins and T-stages Accurate Predictors of Local Control?, **American J. Otolaryngol.** vol 22 p.395-399, 2001.

SIEWET M., DRESSMAN J., BROWN C.B. and SHAH V.P., FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms, **AAPS Pharm. Sci. Tech.** 4 (1) Article 7, 2004.

SILVA M.L.C., MARTINEZ P.F., IZELI L.N., Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas, **Quim. Nova**, vol. 29 p. 85-92, 2006.

SMITH R.V., Pilot Study of mucosal genetic differences in early smokers and nonsmokers, **Laryngoscope**, 2006 aug; 116 (8): 1375-9.

SOKKER H.H., ABDEL GHAFFAR A.M., GAD Y.H., Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release, **Carbohydr. Polym.** vol 75 p. 222–229, 2009.

SOOD S., SHIFF S.J., YANG C.S. and CHEN X., Selection of topically applied no-steroidal anti-inflammatory drugs for oral cancer chemoprevention, **Oral Oncology**. vol 41 p. 562-567, 2005

SUBHASHINI J., MAHIPAL S.V.K., REDDANNA P., Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro, **Cancer Letters** vol 224 p. 31–43, 2005.

SUBRAMANIAN N., RAY S., GHOSAL K., Formulation Design of self-microemulsifying Drug Delivery Systems for Improved Oral Bioavailability of Celecoxib, **Biol. Pharm.Bull.** vol 27(12) p.1993-1999, 2004.

SUDHAKAR Y., KUTSU K. and BANDYOPADHYAY A.K., Buccal Bioadhesive drug delivery – A promising option for orally less efficient drugs, **J. Control. Release**. vol 114 p.15-40, 2006.

TANOJO, H., Fatty acids as enhancers of drug permeation across human skin. An integrated *in vitro / in vivo* study, **Tese de doutorado**, Leiden University, Lein, The Netherlands, 1996.

THANOU M., VERHOEF J.C. and JUNGINGER H.E., Oral Drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives, **Advanced Drug Delivery Reviews**. vol 52 p.117-126, 2001.

THE MERCK INDEX, **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**, Thirteenth Edition, 2001

URADE M., Cyclooxygenase (COX)-2 as a potent molecular target for prevention and therapy of oral cancer, **Japanese Dental Science Review** vol 44, p. 57-65, 2008.

VENTURA C. A., GIANNONE I., PAOLINO D., Preparation of celecoxib-dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vivo permeation study, **Eur. J. Med. Chemistry**. vol 40 p.624-631, 2005.

VERONESI U and BONANNI B., Chemoprevention: From research to clinical oncology, **European Journal of Cancer**, vol 41 p.1833–1841, 2005.

WANG Z., FUENTES C.F. and SHAPASHAY S.M., Antiangiogenic and Chemopreventive Activities of Celecoxibe in Oral Carcinoma Cell, **The Laryngoscope** 112:Maio 2002.

WANG Z., POLAVARAM R. and SHAPASHAY S.M., Topical inhibition of oral carcinoma cell with polymer delivered celecoxibe, **Cancer Letters**. vol 98 p. 53-58,2003.

WILGUS T.A., KOKI A.T., ZWEIFEL B.S., Chemotherapeutic efficacy of topical celecoxib in a murine model of ultraviolet light B-induced skin cancer. **Mol Carcinog**, vol. 38, p.33–39, 2003.

WILLIAMS A. C. and BARRY B.W., Permeation enhancers, **Advances Drug Delivery Reviews**. Vol 56 p.603-618, 2004.

ZHANG M., MOORE G.A., GARDINER S.J. and BEGG E.J., Determination of celecoxib in human plasma and milk by high-performance liquid chromatographic assay, **J. Chromatography B**.vol 830 p.245-248,2006.