



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Beatriz Ribeiro do Amaral

Administração transbucal do benznidazol: estudos de permeabilidade *ex vivo* e desenvolvimento de filmes poliméricos

Florianópolis - SC

2020

Beatriz Ribeiro do Amaral

Administração transbucal do benznidazol: estudos de permeabilidade *ex vivo* e desenvolvimento de filmes poliméricos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestra em Farmácia
Orientador: Prof. Thiago Caon, Dr.

Florianópolis - SC

2020

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

Ribeiro do Amaral, Beatriz

Administração transbucal do benznidazol: estudos de permeabilidade ex vivo e desenvolvimento de filmes poliméricos / Beatriz Ribeiro do Amaral ; orientador, Thiago Caon, 2020.

98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Administração bucal. 3. Benznidazol. 4. Monoterpenos. 5. Filmes bucais. I. Caon, Thiago. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Beatriz Ribeiro do Amaral

Administração transbucal do benznidazol: estudos de permeabilidade *ex vivo* e desenvolvimento de filmes poliméricos

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

Prof. Thiago Caon, Dr.
Orientador (UFSC)

Prof^a. Angela Machado De Campos, Dra.
Membro (UFSC)

Prof^a. Carmen Maria Olivera Müller, Dra.
Membro (UFSC)

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

Elenara Maria Teixeira Lemos-Senna
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Thiago Caon, Dr.
Orientador

Florianópolis - SC, 2020.

Este trabalho é dedicado à minha bisavó Maria Silvéria Menk (*in memoriam*), que foi portadora da doença de Chagas e não teve acesso ao tratamento em vida.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria Cecília, por sempre apoiar as minhas escolhas e confiar em mim. Por ser uma inspiração, pela sua força e coragem.

Ao meu pai, Cristiano, pela sabedoria e pela sua visão sensível sobre o mundo. Por me ensinar a acreditar nas coisas boas e confiar na vida.

Aos meus irmãos, Julia e Martim, e minha cunhada Sarah, por estarem sempre ao meu lado e cuidarem de mim. À minha sobrinha Olivia, por ser uma criança iluminada.

Ao meu companheiro, Yuri, por deixar meus dias mais leves e por cuidar de mim. Pelas risadas, carinho, filosofias e inspirações, e por navegar comigo pelo caos da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Caon, por toda a dedicação, ensinamentos, paciência e apoio. Por abrir portas para mim e confiar no meu trabalho, por sempre trazer ânimo e alegria para toda a nossa equipe e acreditar em nosso potencial.

À Rose, colega e amiga, pelo companheirismo, parceria, aprendizados e por ser uma pessoa tão iluminada.

À Débora, pela dedicação, por ter acompanhado o nosso trabalho e sempre estar presente para nos oferecer apoio, com sabedoria e carinho.

À Gabriela, pelas conversas e filosofias sobre a vida, pela leveza e alegria e pelas contribuições com este trabalho.

À Elisa, pela sua natureza questionadora e interessada, que foram uma inspiração para mim.

Ao Adalberto e ao Rodrigo, pela colaboração no desenvolvimento dos filmes, pelas ideias incríveis, paciência e bom humor.

Ao Prof. Dr. Alexandre Parize, pela colaboração no desenvolvimento dos filmes e todas as suas contribuições.

A todos os professores e colegas do laboratório de farmacotécnica, pelas risadas, conversas, apoio e chimarrão.

Aos amigos queridos Gio, Rafa, Yuri, Thales, Joca, Zilmar e Diego, por todos os anos de amizade, comemorações, risadas, desabafos, e todo o carinho.

A minha amiga Dandara, pelas parcerias de vida, por acreditar no meu trabalho e sempre me trazer reflexões importantes. Pelas conversas sobre a vida e além, pela força e pelas risadas.

Ao LAFEPE, por disponibilizar o fármaco para este projeto.

À CAPES e CNPQ pela bolsa e apoio financeiro deste projeto.

À UFSC e ao PGFar por viabilizarem este projeto.

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho e tornaram possível concretizá-lo.

A posse do conhecimento sem ser acompanhada de uma manifestação ou expressão em ação é como o amontoamento de metais preciosos, uma coisa vã e tola. O conhecimento é, como a riqueza, destinado ao uso (O Caibalion).

RESUMO

O benznidazol (BZN) ainda é o único fármaco disponível para o tratamento da doença de Chagas na maior parte dos países endêmicos. Quando administrado por via oral, altas doses são necessárias devido a um alto metabolismo hepático e sua toxicidade é o maior motivo de abandono do tratamento. Além disto, estudos *in vitro* sugerem que a superexpressão das proteínas P-gp e Mrp-2 induzida pelo BZN poderia contribuir para o aumento do efluxo intestinal do fármaco, o que explicaria o declínio da eficácia terapêutica na fase crônica da doença. Devido a estas complicações, a administração transbucal do BZN foi investigada, considerando que esta rota evita o metabolismo de primeira passagem hepático e é caracterizada por uma alta permeabilidade. O BZN foi aplicado sobre a mucosa bucal suína em câmara de difusão de Franz (5 mg mL⁻¹) após pré-tratamento com monoterpenos naturais puros (eugenol, carvacrol e limoneno). Estes agentes foram selecionados devido a possibilidade de atuarem sinergicamente com o BZN frente ao *Trypanosoma cruzi*. Análises de DSC e FT-IR foram realizadas para investigar os mecanismos envolvidos no aumento da absorção do fármaco. O fluxo de permeabilidade do BZN aumentou em 2,5, 2,8 e 4,7 vezes após o pré-tratamento com eugenol, carvacrol e limoneno, respectivamente. As análises de DSC e FT-IR sugeriram que o transporte do BZN através da mucosa correlaciona-se com o log P e tamanho do monoterpeno. Limoneno, o promotor mais eficaz, apresentou maior interação com domínios apolares do epitélio bucal. A partir destes resultados, filmes bucais com base em álcool polivinílico (PVAL), contendo BZN, foram produzidos pelo método de termoprensagem. Formulações contendo propilenoglicol (PG) como plastificante e timol (TM) como promotor de absorção também foram preparadas. Os filmes foram caracterizados através de análises térmicas, espectrais, morfológicas, mecânicas, estudos de absorção de água e permeabilidade *ex vivo*. Os filmes obtidos se mostraram homogêneos, uniformes e não porosos e mantiveram o BZN em sua forma amorfa mesmo após 90 dias de armazenamento. Além disso, os filmes contendo PG e TM apresentaram propriedades mecânicas adequadas para aplicação bucal, sendo flexíveis, macios e resistentes, características relevantes para a aceitabilidade pelos pacientes. Os estudos de cinética de absorção de água mostraram que os filmes, em particular aqueles contendo PG, são capazes de absorver maiores quantidades de água em umidades relativas de 50 e 75 %, em um período de 24 h, uma informação relevante durante o armazenamento dos filmes. A adição de TM aumentou em cerca de 6 vezes a absorção do BZN em relação à solução controle, além de aumentar a erosão da matriz polimérica. Desta forma, é possível observar que a via transbucal se mostrou promissora como alternativa à administração oral do BZN, sendo que a sua absorção a partir de filmes bucais poliméricos é possível, e pode ser aumentada através do uso de monoterpenos com características mais lipofílicas e com pequena massa molecular.

Palavras-chave: administração bucal; benznidazol; monoterpenos; filmes bucais.

ABSTRACT

Benznidazole (BZN) represents the only drug available for the treatment of Chagas' disease in most endemic countries. When it is administered orally, high doses should be considered due to high hepatic metabolism and its toxicity has been the main reason for treatment withdrawal. Moreover, *in vitro* studies suggest that the P-gp and Mrp-2 protein overexpression induced by the BZN could contribute to the increase of the intestinal efflux of the drug, which would explain the decline in therapeutic efficacy in the chronic phase of the disease. Because of these complications, transbuccal administration of BZN was investigated, considering that this route avoids the first-pass hepatic metabolism and is characterized by a high permeability. BZN was applied on the porcine buccal mucosa in Franz-type diffusion chambers (5 mg mL^{-1}) after the pretreatment with pure natural monoterpenes (eugenol, carvacrol and limonene). These agents were selected based on a possible synergistic action with BZN against *Trypanosoma cruzi*. DSC and FT-IR analyzes were performed to investigate the enhancing mechanisms of drug absorption. The permeability flux of BZN increased by 2.5, 2.8 and 4.7 times after pretreatment with eugenol, carvacrol and limonene, respectively. The DSC and FT-IR analyzes suggested that the transport of the BZN through the buccal mucosa may be correlated with the log P and molecular mass of the monoterpenes. Limonene, the most effective absorption chemical enhancer, showed greater interaction with nonpolar domains of the buccal epithelium. From these results, polyvinyl alcohol (PVAL) buccal films were developed by the selecting the thermo-pressing method. Formulations containing propylene glycol (PG) as a plasticizer and thymol (TM) as an absorption chemical enhancer were also developed. The films were characterized by thermal, spectral, morphological and mechanical analysis, and also by water absorption and *ex vivo* permeability studies. Homogeneous, uniform and non-porous films were obtained and BZN was maintained in amorphous form even after 90 days of storage. In addition, films containing PG and TM showed mechanical properties suitable for buccal application. Flexible, soft and resistant films were obtained, relevant characteristics to improve patient acceptability. Water absorption kinetic studies have shown that the films, in particular those containing PG, may absorb greater amounts of water at 50 and 75% relative humidity over a 24-hour period, a relevant information during the film storage. The addition of TM increased both buccal absorption of BZN (approximately 6 times when compared to the control solution) and the erosion of the polymer matrix. Taken together, these results suggest that the transbuccal route is a promising alternative to the traditional oral administration of BZN. Moreover, a significant drug absorption from polymeric buccal films may be achieved, which may be even improved after the inclusion of monoterpenes presenting more lipophilic characteristics and small molecular mass.

Keywords: buccal delivery; benznidazole; monoterpenes; buccal films.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 2. Estrutura química do benznidazol.....	22
Figura 3. Camadas da mucosa bucal	27
Figura 4. Vias de transporte de fármacos através da mucosa bucal.	28
Figura 5. Câmara de difusão de Franz.....	30
Figura 6. Estrutura química do eugenol	32
Figura 7. Estrutura química do carvacrol	33
Figura 8. Estrutura química do timol.....	33
Figura 9. Estrutura química do limoneno	34
Figura 10. Termoprensa.....	38

Capítulo I - Artigo publicado

Fig. 1. (A) Benznidazole thermodynamic solubility in phosphate buffered saline with increasing concentrations of Tween [®] 80. (B) Thermodynamic solubility of benznidazole in propylene glycol (PG); 50% PG in water (PG:H ₂ O) and phosphate buffered saline (PBS).....	56
Fig. 2. Buccal permeability profile of benznidazole (5 mg m L ⁻¹) alone (●) and with undiluted penetration enhancers pre-treatment through porcine buccal mucosa: eugenol (□); carvacrol (▼) and limonene (Δ). (n = 6).....	57
Fig. 3. Thermograms of untreated porcine buccal epithelium/control (A), and epithelium treated with propylene glycol (B); benznidazole in propylene glycol (5 mg m L ⁻¹) (C); limonene (D); eugenol (E) and carvacrol (F). (n = 2).....	58
Fig. 4. (A) Schema of FT-IR analysis interpretation. Blue bands are related to protein structures and pink band are related to lipid structures. (B) FT-IR spectra of untreated porcine buccal epithelium (i) and treated with propylene glycol (ii); benznidazole in propylene glycol (5 mg m L ⁻¹) (iii); eugenol (iv); carvacrol (v) and limonene (vi). (n = 2).....	59

Capítulo II - Artigo a ser submetido para avaliação

Fig. 1 X-ray powder diffraction patterns of freshly prepared films (left) and after 90 days (right). “a”, “b” and “c” represent PVAL-BZN, PVAL-BZN-PG and PVAL-BZN-PG-TM films,

respectively.....	74
Fig. 2 Calculated X-ray powder diffraction pattern of crystalline PVAL (BUNN, 1948) and BZN (SOARES-SOBRINHO et al., 2008). The reflections related to the (10-1) and the (101) planes of the PVAL structure are indicated.....	74
Fig. 3 DSC thermograms of the different films and BZN. (—) PVAL film; (···) PVAL-BZN; (---) PVAL-PG film; (-··) PVAL-BZN-PG film; (- - -) PVAL-BZN-PG-TM and (-·) BZN powder.....	76
Fig. 4 Thermogravimetric analysis the different films and BZN. (—) PVAL film; (---) PVAL-BZN; (-··) PVAL-PG film; (- - -) PVAL-BZN-PG film; (-·) PVAL-BZN-PG-TM and (--- ---) BZN powder.....	77
Fig. 5 FTIR analysis of the isolated constituents of the films and the different film blends.....	78
Fig. 6 Stress-strain curve for different PVAL-based films: (—) PVAL; (···) PVAL-BZN; (---) PVAL-BZN-PG and (-··) PVAL-BZN-PG-TM.....	79
Fig. 7 Permeability profile of BZN on esophageal mucosa from control solution (2.5 mg mL ⁻¹) (●) and the different film formulations: PVAL-BZN (○); PVAL-BZN-PG (▼) and PVAL-BZN-PG-TM (Δ). (n=6).....	81
Fig. 8 SEM images of BZN powder and film formulations before and after the permeability studies.....	82

LISTA DE TABELAS

Capítulo I – Artigo publicado

Table 1. Permeation parameters of benznidazole (BZN) alone and with penetration enhancers pre-treatment: eugenol (EG), carvacrol (CV) and limonene (LM).....	57
Table 2. BZN buccal mucosal retention, BZN permeated and enhancement ratio; physicochemical properties of the monoterpenes.....	58
Table 3 Effect of propylene glycol (PG), benznidazole in propylene glycol (BZN/PG), and neat monoterpenes eugenol (EG), carvacrol (CV) and limonene (LM)] at the transition midpoint temperature (T_m) and enthalpy (ΔH) of the main thermal transitions of the porcine buccal epithelium ($n = 2$).....	58
Table 4. Permeation enhancers effect in the buccal epithelium structure on FT-IR spectrum wavenumbers. ($n = 2$).....	60

Capítulo II – Artigo a ser submetido para avaliação

Table 1. Constitution of the different films.....	67
Table 2. Properties of PVAL film formulations: thickness, contact-angle, swelling index and water sorption rate at 50% and 75% RH.....	73
Table 3. Thermal characteristics of the film blends and BZN obtained from DSC analysis.....	75
Table 4. Tensile data of different compositions of PVAL-based films.....	79
Table 5. Buccal permeability parameters of benznidazole (control) and of PVAL-BZN films.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância/ *Analysis of variance*

ASB – *Artificial Saliva Buffer*

AUC – Área sob a curva

BZN – Benznidazol

CD – *Chagas' disease*

CI₅₀ – Concentração inibitória média

C_{max} – Concentração máxima do fármaco no sangue

DC – Doença de Chagas

DRX – Difração de raios-X

DSC – Calorimetria diferencial de varredura / *Differential scanning calorimetry*

DTNs – Doenças tropicais negligenciadas

ER – *Enhancement ratio*

FF – Forma farmacêutica

FMN – Riboflavina 5-fosfato

FT-IR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier / *Fourier-transform infrared spectroscopy*

GnHR - Hormônio liberador de gonadotrofina

GRAS - Geralmente reconhecidos como seguros / *Generally regarded as safe*

HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência/ *High-performance liquid chromatography*

KRB – *Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer*

LAFEPE – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

OMS – Organização mundial de saúde

PG – Propilenoglicol / *Propylene glycol*

PVAL – Álcool polivinílico / *Polyvinyl alcohol*

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RH – *Relative humidity*

SEM – *Scanning electron microscopy*

TcNTR – Nitroreductase mitocondrial NADH-dependente de tipo 1

TGA – Análise termogravimétrica/ *Thermogravimetric analysis*

TM – Timol / *Thymol*

XRD – *X-ray diffraction*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	DOENÇA DE CHAGAS	19
3.1.1	Agente etiológico, vetor e formas de transmissão	19
3.1.2	Sintomas	20
3.1.3	Tratamento	21
3.1.3.1	<i>Esquema terapêutico</i>	<i>21</i>
3.2	Benznidazol	22
3.2.1	Características físico-químicas	22
3.2.2	Mecanismo de ação	23
3.2.3	Farmacocinética	23
3.2.4	Efeitos adversos.....	24
3.3	Mucosa bucal	25
3.3.1	Anatomia e fisiologia	26
3.3.2	Rotas de permeabilidade.....	27
3.3.3	Modelos de avaliação de permeabilidade	28
3.3.3.1	<i>In vivo</i>	<i>28</i>
3.3.3.2	<i>Ex vivo</i>	<i>29</i>
3.3.3.3	<i>In vitro</i>	<i>30</i>
3.3.4	Promotores de absorção	31
3.3.4.1	<i>Terpenos</i>	<i>31</i>
3.3.4.1.1	Eugenol.....	32
3.3.4.1.2	Carvacrol.....	32

3.3.4.1.3	Timol.....	33
3.3.4.1.4	Limoneno.....	34
3.4	Formas farmacêuticas bucais.....	34
3.4.1	Filmes poliméricos.....	35
<i>3.4.1.1</i>	<i>Métodos de preparo.....</i>	<i>36</i>
3.4.1.1.1	Evaporação de solvente.....	36
3.4.1.1.2	Extrusão à quente.....	37
3.4.1.1.3	Termoprensagem.....	37
<i>3.4.1.2</i>	<i>Caracterização físico-química.....</i>	<i>38</i>
3.4.1.2.1	Força de tração e percentagem de alongamento.....	38
3.4.1.2.2	Análises térmicas.....	38
3.4.1.2.3	Difração de raios-X (DRX).....	39
3.4.1.2.4	Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR).....	39
3.4.1.2.5	Morfologia.....	39
3.4.1.2.6	Teor de água.....	40
3.4.1.2.7	Mucoadesão e tempo de residência <i>in vitro</i>	40
3.4.1.2.8	Permeabilidade <i>ex vivo</i>	40
4	CAPÍTULO I – ARTIGO PUBLICADO.....	53
5	CAPÍTULO II – ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA AVALIAÇÃO.....	62
6	DISCUSSÃO GERAL.....	92
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 8 milhões de indivíduos no mundo estão infectados pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC), sendo esta uma doença endêmica na América Latina. Cerca de 10.000 mortes por ano são causadas pela DC, sendo que, no Brasil, esta é uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias (CONITEC, 2018; OMS, 2018). A infecção ocorre após a transmissão vetorial por insetos da subfamília Triatominae (popularmente conhecidos como barbeiros), porém, também pode ocorrer através de ingestão, transfusão de sangue, transmissão congênita, transplante de órgãos e acidentes de laboratório (COURA; VIÑAS, 2010; PERDOMO *et al.*, 2013). A DC figura entre a lista de doenças tropicais negligenciadas (DTN) da Organização Mundial de Saúde por possuir um histórico de negligência e falta de investimentos, principalmente por atingir populações de baixa renda, em regiões sem estruturas adequadas de saneamento básico e em contato com os insetos vetores (OMS, 2020).

Dois fármacos nitroheterocíclicos estão disponíveis para o tratamento da DC, nifurtimox e benznidazol (BZN). Apesar de ambos apresentarem eficácia limitada, especialmente na fase crônica da doença, o BZN costuma ser mais bem tolerado. Por conta disso, é recomendado pela OMS como o tratamento de primeira linha, tanto para crianças quanto adultos e é o único disponível na maior parte dos países endêmicos (PERDOMO *et al.*, 2016; VINUESA *et al.*, 2017). O BZN é administrado pela via oral, na forma de comprimidos, em doses de 5 mg/kg/dia, com uma dose máxima de 300 mg por dia (CONITEC, 2018). É rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, alcançando picos de concentração plasmática entre 3-4 h, com uma meia-vida de 12 h em humanos (MOLINA *et al.*, 2017). Estudos farmacocinéticos e de distribuição tecidual, realizados após administração oral de BZN, sugerem um alto metabolismo primeira passagem, o que pode explicar a eficácia limitada do fármaco (PERIN *et al.*, 2017). O BZN é metabolizado principalmente pelo sistema do citocromo P450, gerando como metabólitos majoritários o 2-amino-imidazol e o 2-hidroxi-imidazol, que são excretados na urina (RAETHER; HÄNEL, 2003). Diversos metabólitos são produzidos como consequência da redução do grupamento nitro do BZN, e o seu acúmulo, interação com outros componentes celulares, reações alérgicas ou a combinação destes fatores podem estar associados com o perfil tóxico deste fármaco (MOLINA *et al.*, 2015). Estudos *in vitro* sugerem que a superexpressão das proteínas P-gp e Mrp-2, induzida pelo BZN, pode contribuir para um maior efluxo do fármaco, o que explicaria o declínio da eficácia terapêutica na fase crônica da

doença (PERDOMO *et al.*, 2013). Consequentemente, altas doses de BZN seriam necessárias para atingir a concentração terapêutica, aumentando ainda mais os riscos de toxicidade. Cerca de 76 % dos pacientes tratados com BZN apresentam algum tipo de efeito adverso, que incluem distúrbios de pele, gastrointestinais e nervosas, e a toxicidade do fármaco representa a principal razão para abandono do tratamento (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; MOLINA *et al.*, 2015). Além disso, a falha terapêutica durante a fase crônica da doença pode estar relacionada à seleção de parasitas altamente resistentes (SANTOS *et al.*, 2008).

Frente às complicações associadas à administração oral de BZN, este estudo visou investigar a mucosa bucal como uma rota alternativa. Esta rota é facilmente acessível e a formulação pode ser prontamente removida caso necessário (SMART, 2005). Além disso, esta mucosa é caracterizada por uma baixa atividade enzimática, é altamente vascularizada e confere acesso direto à veia jugular interna, alcançando a circulação sistêmica sem metabolização prévia. Além disso, a administração de fármacos por essa via poderia permitir uma redução de dose, de forma a reduzir ou até mesmo evitar efeitos adversos. De forma geral, a via transbucal apresenta maior permeabilidade a fármacos que a via transdérmica (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005), e o fato do BZN ocasionar distúrbios na pele como efeito adverso pode ser considerado como uma desvantagem para a aplicação do mesmo pela via transdérmica, outra justificativa para o direcionamento para a rota bucal.

Diferentes tipos de formas farmacêuticas têm sido explorados a fim de incrementar a biodisponibilidade de fármacos e reduzir seus efeitos adversos. Recentemente, filmes bucais tem recebido maior atenção para ambos tratamentos locais e sistêmicos (ELEFTHERIADIS *et al.*, 2019; MONTENEGRO-NICOLINI; MORALES, 2017; TIAN *et al.*, 2019). Filmes bucais mucoadesivos são definidos como FFs constituídas por uma ou múltiplas camadas, projetadas para se fixarem à mucosa bucal, liberando o fármaco local ou sistemicamente, com início rápido, liberação controlada ou prolongada. Estes sistemas são bem aceitos pelos pacientes, um parâmetro-chave no desenvolvimento de novos produtos (TIAN *et al.*, 2019). Um filme ideal deve ser flexível e forte o suficiente para resistir ao manuseio e aos movimentos bucais. Também devem apresentar forte capacidade de mucoadesão, ser biocompatíveis e, preferencialmente, biodegradáveis (BARUA *et al.*, 2016; MORALES; MCCONVILLE, 2011).

Uma vez que os fármacos administrados com mais sucesso pela via bucal são pequenos e lipofílicos ($\log P = 1,3-3,3$) (SMART, 2005), e que o BZN apresenta um valor de $\log P$ de 0,772 (MAXIMIANO *et al.*, 2010), o uso de promotores químicos de absorção foi considerado neste estudo, já que a expectativa era de baixa permeabilidade. Promotores de absorção são adicionados a formulações farmacêuticas com o intuito de aumentar a permeabilidade de membrana ou a taxa de absorção de um fármaco, sem danificar a membrana ou causar toxicidade (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005). Apesar de poucos estudos sugerirem o uso de terpenos de origem natural como promotores de absorção de fármacos pela via transbucal, seu uso na administração transdérmica já é conhecido (CHEN *et al.*, 2016). Estes agentes são considerados relativamente seguros e apresentam baixa toxicidade, sendo usados como agentes flavorizantes pelas indústrias farmacêutica e alimentícia (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2015; THAKUR; MICHNIAK; MEIDAN, 2007). Os monoterpenos líquidos eugenol, carvacrol e limoneno foram selecionados para a primeira etapa deste trabalho, considerando que são Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e apresentam valores de $\log P$ distintos. Para a segunda etapa do trabalho, o monoterpeno sólido timol (isômero ao carvacrol) foi selecionado. Estudos *in vitro* sugerem que estes compostos apresentam potencial tripanocida, sendo que o limoneno apresenta sinergismo com o BZN (AZEREDO; SOARES, 2013; MORENO *et al.*, 2018; SOBRAL-SOUZA *et al.*, 2014).

Em resumo, este trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira visou investigar a administração bucal do BZN através do modelo *ex vivo* de difusão em câmaras de Franz, utilizando os terpenos eugenol, carvacrol e limoneno como promotores químicos de absorção. Os mecanismos de promoção de absorção foram elucidados através de análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). A segunda etapa teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos bucais contendo BZN, produzidos através do método de termoprensagem. O álcool polivinílico (PVAL) foi selecionado como polímero por apresentar uma temperatura de fusão próxima à do BZN, o que permitiria trabalhar com uma temperatura adequada na termoprensa sem que ocorresse degradação do fármaco. Além disso, o PVAL também apresenta propriedades mecânicas adequadas, além de ser biocompatível e biodegradável (ABRUZZO *et al.*, 2017). Propilenoglicol foi selecionado como plastificante e o timol foi escolhido como promotor de absorção. Uma extensa caracterização físico-química foi realizada, incluindo análises térmicas, mecânicas, morfológicas e avaliações *in vitro*. Ainda, estudos de permeabilidade *ex vivo* foram realizados em modelo de mucosa esofágica suína.

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a permeabilidade bucal do benznidazol na ausência e presença de diferentes promotores de absorção (terpenos) através do modelo da câmara de Franz, com o subsequente desenvolvimento e caracterização de filmes bucais contendo este fármaco.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologia de quantificação do BZN por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a solubilidade aparente do BZN a fim de selecionar os fluidos doador e receptor para estudo de permeabilidade em câmara de Franz;
- Avaliar a taxa de transporte transbucal do benznidazol utilizando o modelo de difusão da câmara de Franz e mucosa bucal suína;
- Investigar o efeito de terpenos como promotores químicos de absorção;
- Avaliar a quantidade de fármaco retida na mucosa bucal na presença e ausência dos promotores de absorção;
- Realizar estudos mecânicos utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) para identificar possíveis rotas de transporte do fármaco e mecanismo de ação dos promotores químicos;
- Desenvolver filmes bucais contendo BZN utilizando o método de termoprensagem;
- Realizar a caracterização físico-química dos filmes produzidos, através de análises térmicas como DSC e análise termogravimétrica (TG), análises espectroscópicas (FT-IR) e difração de raios-X (DRX);
- Analisar as propriedades mecânicas dos filmes através de ensaio de tração e percentagem de alongamento;
- Realizar ensaios *in vitro* para determinar as propriedades de molhabilidade, intumescimento e cinética de sorção de água pelos filmes;
- Avaliar a permeabilidade do BZN dos filmes utilizando o modelo de difusão em câmara de Franz e mucosa esofágica suína.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

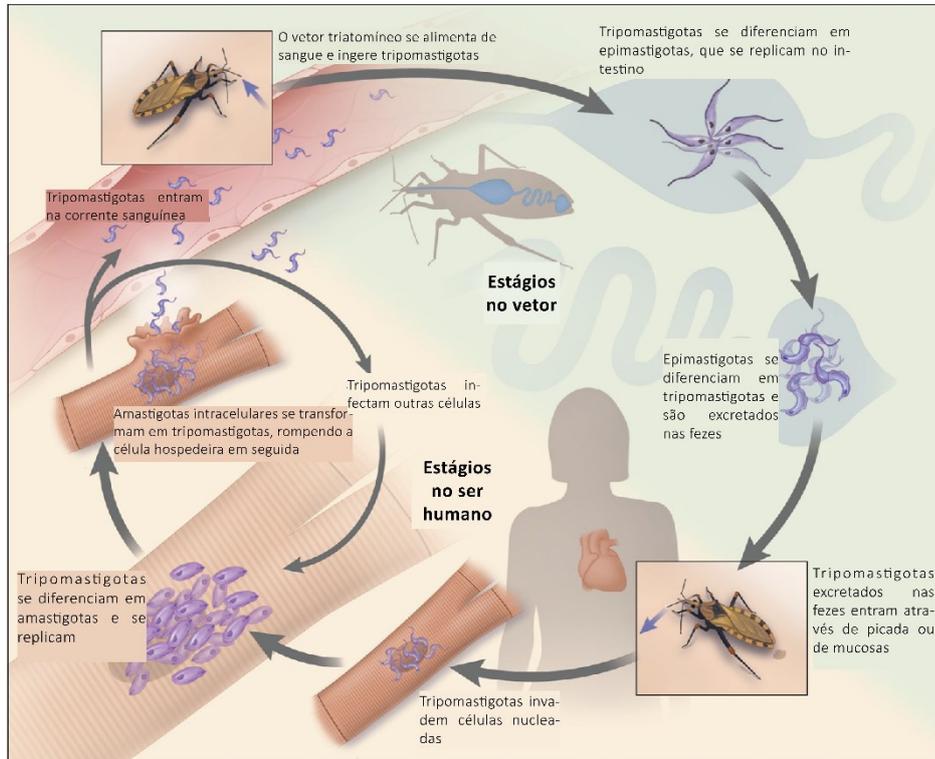
2.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) é uma antropozoonose, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida). Encontra-se na lista de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) da Organização Mundial de Saúde, um grupo de patologias que ocorrem predominantemente em climas tropicais e possuem um histórico de negligência e/ou falta de investimentos, já que atingem principalmente populações de baixa renda, em regiões sem estruturas adequadas de saneamento e com contato próximo a animais vetores (OMS, 2020). Estima-se que cerca de 8 milhões de indivíduos no mundo estejam infectados com este parasita, causando mais de 10.000 mortes por ano em decorrência de complicações da DC. A América Latina é a região mais afetada pela doença (OMS, 2018). Dados obtidos em 2014 estimam entre 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas no Brasil, com estimativas de prevalência entre 1,0 a 2,4% da população, com elevada carga de mortalidade, sendo uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias no país. Entre os anos 2000 e 2013, foram registradas 68.206 mortes pela DC, contabilizando uma média de 4.872 mortes por ano (CONITEC, 2018).

2.1.1 Agente etiológico, vetor e formas de transmissão

A principal forma de infecção se inicia quando formas tripomastigotas metacíclicas, presentes nas fezes de insetos hematófagos da subfamília Triatominae, alcançam as células do hospedeiro através da picada do inseto, assumindo a forma amastigota do parasita (Figura 1). Após diversos ciclos de divisão binária no citoplasma, a forma amastigota se diferencia em tripomastigota, rompendo a membrana celular, atingindo a circulação sanguínea e infectando células em outros locais do corpo (SALES JUNIOR *et al.*, 2017). Os insetos vetores da doença são encontrados principalmente em áreas rurais da América Latina e no Sul dos EUA, porém, o parasita também pode ser adquirido através de ingestão, transmissão congênita, transfusão de sangue, transplante de órgãos e acidentes de laboratório (PERDOMO *et al.*, 2013).

Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Bern (2011), traduzido e adaptado pela autora

2.1.2 Sintomas

Na transmissão através de vetores, ocorre um período de incubação que tem duração entre 1-2 semanas, onde se inicia a fase aguda da doença. Os pacientes podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas moderados e inespecíficos como febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica. Em alguns casos, um nódulo na pele (também conhecido por chagoma), ou um edema na pálpebra (sinal de Romaña) podem indicar o local da inoculação (BERN, 2015). Estes sintomas da fase aguda, quando observados, desaparecem espontaneamente em decorrência de uma resposta imune que controla a replicação do parasita, mesmo sem a administração de medicamentos tripanocidas (RASSI JR; RASSI; REZENDE, 2012). Por conta disso, a grande maioria dos casos de infecção na fase aguda não são detectados. Sequencialmente, na fase indeterminada da doença, o indivíduo se mantém parasitêmico, porém, há ausência de sintomas clínicos. Essa fase pode se estender por meses ou por toda a vida (HEMMIGE; TANOWITZ; SETHI, 2012). Cerca de 20–30 % dos pacientes que passam pela fase aguda sem tratamento desenvolvem cardiomiopatia na fase crônica da doença, uma forma clínica com maior morbidade e mortalidade, enquanto que 15–20% progridem para

formas digestivas da doença, que incluem megaesôfago e megacólon (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012; RASSI JR; RASSI; REZENDE, 2012).

2.1.3 Tratamento

Atualmente, as duas opções terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas são os compostos nitroheterocíclicos nifurtimox e benzindazol (BZN). Apesar de ambos os tratamentos apresentarem eficácia limitada durante a fase crônica da doença, o BZN é mais tolerado (MOLINA *et al.*, 2015). Por conta disto, representa o fármaco de primeira escolha para a DC e recomendado pela OMS para o tratamento da doença tanto em crianças quanto adultos (VINUESA *et al.*, 2017). É também o único disponível em grande parte dos países endêmicos (PERDOMO *et al.*, 2016). Embora o BZN tenha sido inicialmente desenvolvido pela indústria farmacêutica Roche, em 2003, esta concedeu a licença e direitos sobre o BZN para o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) (HONORATO *et al.*, 2014). Em 2008, o LAFEPE passou a ser a única empresa produtora do BZN. Em 2012, após um período de escassez mundial do medicamento, a produção foi também iniciada pela indústria farmacêutica argentina ELEA (DIAS *et al.*, 2014). Atualmente, ELEA e LAFEPE permanecem como os únicos fornecedores de BZN no mundo. O BZN está incluído na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), na forma de comprimidos de 12,5 e 100 mg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

2.1.3.1 Esquema terapêutico

De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da DC (CONITEC, 2018), o tratamento da DC é realizado com BZN, administrado pela via oral, na forma de comprimidos, em um regime de tratamento de 5 mg/kg/dia, uma a três doses por dia (dose máxima de 300 mg por dia), por 60 dias. Para indivíduos com mais de 60 kg, a alternativa é prolongar o tratamento para adequação à dosagem ideal, utilizando o esquema de 300 mg por dia pelo número de dias equivalente ao peso do indivíduo, limitando-se a um máximo de 80 dias (por exemplo, um indivíduo com 70 kg utilizaria uma dose de 300 mg/dia por 70 dias). Para crianças, que demonstram maior tolerância ao tratamento, a dose utilizada é de 5-10 mg/kg/dia, em duas tomadas diárias, por 60 dias (CONITEC, 2018; MOLINA *et al.*, 2015). No

Brasil, o BZN é disponibilizado na forma de comprimidos de 12,5 mg (pediátrico) ou 100 mg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

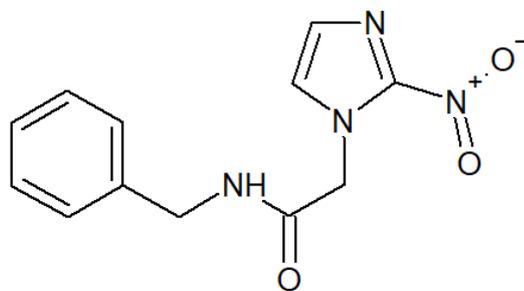
Em casos onde ocorre intolerância ao tratamento com BZN, ou se existe expectativa de maior benefício, a administração de nifurtimox pode ser considerada. Este medicamento é adquirido por demanda em casos específicos, sendo fornecido pela Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. O nifurtimox está disponível em comprimidos de 120 mg, e é utilizado nas doses de 15 mg/kg/dia em crianças e 10 mg/kg/dia em adultos, sendo administrado 3x ao dia, por 60 dias (CONITEC, 2018; DIAS *et al.*, 2016).

2.2 BENZNIDAZOL

2.2.1 Características físico-químicas

O fármaco BZN é quimicamente denominado 2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida (Figura 2), apresentando fórmula molecular $C_{12}H_{12}N_4O_3$ e massa molar de 260,25 g mol^{-1} (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Figura 2. Estrutura química do benznidazol



Fonte: Autora

Apresenta-se como um pó cristalino, levemente amarelado, inodoro, insípido e estável ao ar, com faixa de fusão entre 188-190 °C. De acordo com a 6ª edição da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019), o BZN é praticamente insolúvel em água, muito pouco solúvel em etanol e pouco solúvel em metanol. Valores experimentais mostraram divergências em relação à classificação farmacopeica, encontrando uma solubilidade de 0,237 mg mL^{-1} em água (muito pouco solúvel), 13,078 mg mL^{-1} em metanol (moderadamente solúvel), 4,989 mg mL^{-1} em etanol (pouco solúvel), 30,546 mg mL^{-1} em acetona (moderadamente solúvel) e um log P de

0,772. Estas informações, juntamente com dados de permeabilidade intestinal para este fármaco, permitiram sua inclusão na classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, a qual engloba fármacos que apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade (MAXIMIANO *et al.*, 2010).

2.2.2 Mecanismo de ação

Atualmente, o mecanismo de ação do BZN ainda não está completamente elucidado. Acredita-se que o BZN (um pró-fármaco) seja ativado no interior do parasita por uma nitroredutase mitocondrial NADH-dependente de tipo 1 (TcNTR), utilizando riboflavina 5-fosfato (FMN) como cofator (CAMPOS *et al.*, 2014). Neste processo, a região 2-nitroimidazólica do BZN é convertida em hidroxilamina que, por sua vez, é convertida em glioxal dialdeído. Este último é um produto altamente reativo que forma complexos moleculares a partir de ligações covalentes com DNA, RNA, proteínas e tióis de baixo peso molecular. A formação de glioxal-guanosina impede a síntese de novas fitas de DNA, enquanto a formação de glioxal-tiol inibe o sistema antioxidante do parasita, tornando-o mais suscetível à danos oxidativos (CALDAS; SANTOS; NOVAES, 2019). A resistência ao fármaco pode estar associada com a perda de uma cópia do cromossomo que contém o gene de TcNTR, assim como a mutações na região de ligação com o cofator FMN, o que resulta na perda de atividade enzimática responsável pela ativação do fármaco (MEJIA *et al.*, 2012).

2.2.3 Farmacocinética

Os dados referentes à farmacocinética do BZN, especialmente em humanos, ainda são limitados. A sua administração é realizada pela via oral e o fármaco é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, apresentando picos de concentração plasmática entre 3-4 h, com tempo de meia-vida de 12 h (MOLINA *et al.*, 2017). Sua biodisponibilidade relativa média é de 91,7% (comprimido oral *versus* solução oral) (RAAFLAUB; ZIEGLER, 1979). Não encontrados estudos disponibilizando o BZN na forma intravenosa e, desta forma, sua biodisponibilidade absoluta é desconhecida (SOY *et al.*, 2015). Em estudo de revisão sistemática e meta-análise, Wiens *et al.* (2016) estimaram valores de diversos parâmetros farmacocinéticos, com resultados consistentes entre os estudos analisados. A área sob a curva (AUC) e a concentração plasmática máxima (C_{max}) foram de 51,31 mg h L⁻¹ e 2,19 mg L⁻¹,

respectivamente. Os valores das constantes de eliminação (k_{el}) e de absorção (K_a) foram de 0,052 e 1,16 h⁻¹, respectivamente. Os valores de meia-vida de absorção e de eliminação foram 0,60 e 13,27 h, respectivamente. O *clearance* oral e volume de distribuição foram de 2,04 L h⁻¹ e 39,19 L, respectivamente.

De acordo com Raaflaub (1980), a faixa terapêutica ideal encontra-se entre 3-6 mg L⁻¹ e esse valor ainda é usado como referência. No entanto, existem poucas informações acerca do desenho experimental deste estudo (MOLINA *et al.*, 2017). A concentração de 6 mg L⁻¹ é equivalente à 23 µM de BZN. A maior parte das cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas em laboratório apresentam uma concentração inibitória média (CI₅₀) muito abaixo desse valor. Em um estudo recente realizado por Mello *et al.*, (2020), por exemplo, observou-se uma CI₅₀ de 8,8 ± 1,0 µM frente as formas amastigotas do parasita. Entretanto, em estudo utilizando cepas provenientes de amostras clínicas, Moreno *et al.* (2010) encontraram valores mais elevados de CI₅₀, tanto para epimastigotas quanto amastigotas.

Estudos de farmacocinética e de distribuição tecidual após administração oral de BZN em ratos sugerem um alto metabolismo de primeira passagem, o que pode explicar a eficácia limitada. O fármaco é metabolizado principalmente pelo sistema citocromo P450, gerando como metabólitos majoritários o 2-amino-imidazol e o 2-hidroxi-imidazol, os quais são excretados na urina (RAETHER; HÄNEL, 2003). Como consequência do seu metabolismo, diversos metabólitos são produzidos pela redução dos grupamentos nitro do fármaco. O acúmulo destes metabólitos pode ser responsável por interações com componentes celulares, respostas alérgicas ou a combinação destes fatores, podendo estar associado ao perfil tóxico deste fármaco (MOLINA *et al.*, 2015). Estudos *in vitro* sugerem que a superexpressão das proteínas P-gp e Mrp-2 induzida pelo BZN poderia contribuir para o aumento do efluxo do fármaco, o que explicaria o declínio da eficácia terapêutica na fase crônica da DC (PERDOMO *et al.*, 2016). Consequentemente, altas doses de BZN seriam necessárias para atingir a concentração terapêutica, aumentando ainda mais os riscos de toxicidade.

2.2.4 Efeitos adversos

Reações adversas ao tratamento com BZN são frequentes, principalmente no primeiro mês de tratamento, sendo mais frequentes as desordens da pele (34 %), do sistema gastrointestinal (12,6 %) e do sistema nervoso (11,5 %) (CRESPILLO-ANDÚJAR *et al.*, 2018). O efeito adverso mais comum é a dermatite devido a hipersensibilidade, não estando

relacionada à dose nem a destruição do parasita (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012). Aproximadamente 76% dos pacientes tratados com BZN apresentam algum tipo de reação adversa, sendo que estas ainda são a principal razão para o abandono do tratamento (MOLINA *et al.*, 2015). Entre 12-31% dos pacientes interrompem o tratamento com BZN, na maioria dos casos, por conta de exantema e prurido (HASSLOCHER-MORENO *et al.*, 2012). Além disso, sugere-se que a falha terapêutica comumente observada em pacientes tratados com BZN na fase crônica da doença pode estar associada à seleção de parasitas altamente resistentes, que podem se propagar em áreas endêmicas onde a transmissão vetorial não foi controlada (SANTOS *et al.*, 2008).

2.3 MUCOSA BUCAL

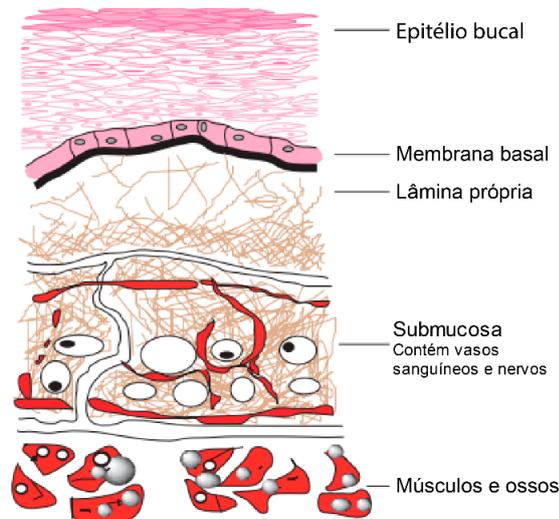
A administração oral de fármacos em formas farmacêuticas convencionais como comprimidos, cápsulas, soluções e suspensões apresenta limitações como a degradação prematura do fármaco no trato gastrointestinal devido ao pH ou enzimas digestivas e metabolismo de primeira passagem hepática. Frente a isto, altas doses de fármaco podem ser necessárias a fim de garantir que se atinja uma concentração terapêutica, o que frequentemente resulta em hepatotoxicidade e aparecimento de efeitos adversos indesejáveis (MACEDO *et al.*, 2020).

Recentemente, a mucosa da cavidade oral, em especial na região bucal (região da bochecha) e sublingual, tem recebido maior atenção como uma via alternativa para a administração de fármacos, tanto para ação local quanto sistêmica. A mucosa bucal é uma via facilmente acessível e a formulação pode ser removida prontamente caso seja necessário (SMART, 2005a). Esta mucosa é caracterizada por uma baixa atividade enzimática, é altamente vascularizada e oferece acesso direto à veia jugular. Desta forma, a circulação sistêmica é facilmente alcançada, evitando-se o metabolismo de primeira passagem. A administração de fármacos por essa via pode permitir a redução da dose de forma a reduzir ou, até mesmo, evitar efeitos adversos. Além disso, a via transbucal apresenta maior permeabilidade do que a via transdérmica, não apenas pela diferença da organização lipídica intercelular, mas também pela diferença em sua composição (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005).

2.3.1 Anatomia e fisiologia

A mucosa bucal consiste no revestimento interno da bochecha, assim como a área entre a gengiva e os lábios superior e inferior. A área média da mucosa bucal é de aproximadamente 100 cm². Tem como função primária proteger os tecidos subjacentes da ação mecânica e química, além de evitar a entrada de substâncias estranhas (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018). A mucosa bucal é composta de epitélio estratificado escamoso (camada mais superficial), que se apoia sobre uma membrana basal, lâmina própria, formada por tecido conjuntivo e submucosa (Figura 3). Nesta região da cavidade oral, o epitélio não é queratinizado, permitindo que este seja mais flexível para permitir o movimento bucal (DIAZ-DEL CONSUELO *et al.*, 2005; MACEDO *et al.*, 2020). A espessura da mucosa bucal varia entre 200-800 μm , sendo o epitélio composto por 40-50 camadas de células, com um tempo de renovação celular entre 5-7 dias (MACEDO *et al.*, 2020; SMART, 2005a). Nas camadas mais profundas do epitélio, as células ainda são mitoticamente ativas, diferenciando-se e aumentando de tamanho, com um formato mais achatado à medida que se aproximam da porção mais externa do epitélio. Esses estágios são representados por quatro camadas, ou seja, a camada basal, espinhosa, intermediária e superficial. A partir da camada espinhosa, é possível observar células com corpos lamelares, que secretam lipídeos no espaço intercelular da região mais externa do epitélio. Essa região contém grandes quantidades de colesterol e de fosfolipídeos (particularmente fosfatidiletanolamina), com poucas ceramidas (DIAZ-DEL CONSUELO *et al.*, 2005; SATTAR; SAYED; LANE, 2014).

As células epiteliais estão imersas em muco, um material intercelular secretado por glândulas salivares como constituinte da saliva. A camada de muco pode ter uma espessura entre 50-450 μm , sendo este constituído principalmente por glicoproteínas chamadas de mucina. Essas moléculas são caracterizadas por um alto peso molecular (0,5 - 20 g mol⁻¹), e podem interagir umas com as outras para formar redes tridimensionais. Além disto, apresentam resíduos de sulfato e ácido siálico, carregados negativamente, que facilita a ligação na superfície de células epiteliais, formando uma camada gelatinosa que ajuda a lubrificar e proteger a mucosa oral (MACEDO *et al.*, 2020; SATTAR; SAYED; LANE, 2014).

Figura 3. Camadas da mucosa bucal

Fonte: Adaptado de Smart *et al.* (2005).

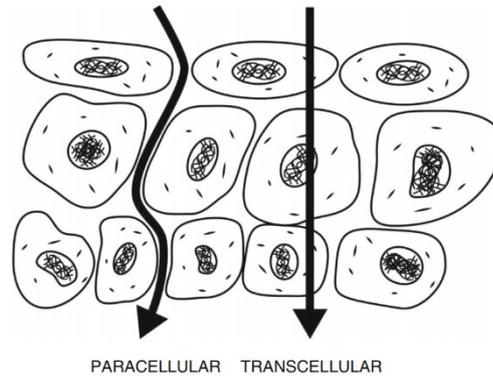
Além do muco, as glândulas parótida, submandibular e sublingual, juntamente com glândulas salivares menores, produzem a saliva, um fluido aquoso moderadamente viscoso, que age como lubrificante, protetor, auxilia na mastigação de alimentos, previne a desmineralização dos dentes, participa na digestão de carboidratos e ajuda a modular a flora oral. A saliva é constituída de muco, proteínas, sais minerais e enzimas, e age como um sistema tampão fraco, com pH entre 5,5 e 7. O grau de estimulação e o horário do dia afetam ambos fluxo de saliva e sua composição, sendo que o fluxo de produção de saliva costuma ser de aproximadamente 0,5 mL/min, produzindo, em média, 1 L de saliva por dia (MACEDO *et al.*, 2020; SMART, 2005a).

2.3.2 Rotas de permeabilidade

Os fármacos administrados pela via bucal são absorvidos pelas veias jugulares acessando diretamente a circulação sistêmica. Entretanto, as camadas mais superficiais da mucosa bucal representam a maior barreira à absorção. Os lipídeos no meio intercelular das camadas mais externas do epitélio podem representar um papel importante na permeabilidade de fármacos por esta via. No caso do epitélio bucal, que não é queratinizado, há predominância de lipídeos mais polares (DIAZ-DEL CONSUELO *et al.*, 2005). Além do epitélio, o próprio muco pode atuar aumentando ou diminuindo a absorção de fármacos, dependendo da natureza físico-química e do veículo (MACEDO *et al.*, 2020). Por possuir tanto regiões hidrofílicas quanto lipofílicas, duas rotas de transporte de fármacos através da mucosa bucal foram

postuladas – a rota paracelular (entre as células), e a rota transcelular (através das células) (Figura 4) (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005).

Figura 4. Vias de transporte de fármacos através da mucosa bucal.



Fonte: Caon *et al.* (2015)

Os fármacos podem ser transportados pelas membranas do epitélio bucal através da difusão passiva, transporte especializado ou endocitose. A difusão passiva representa a principal rota de transporte, a qual pode ser categorizada em via paracelular e transcelular. Enquanto o espaço intercelular e o citoplasma das células apresentam natureza mais hidrofílica, atuando como barreira para a absorção de moléculas lipofílicas, as membranas celulares e os lipídeos intercelulares apresentam natureza mais lipofílica, atuando como barreira para moléculas hidrofílicas. A maioria dos fármacos é transportada pela rota paracelular devido à forma que os lipídeos intercelulares estão organizados. Fármacos mais hidrofílicos tem maior facilidade no transporte pela rota paracelular, enquanto os mais lipofílicos são carregados pela via transcelular. Em geral, o transporte acontece pela rota que oferece menor resistência à penetração do fármaco (PINTO; PINTADO; SARMENTO, 2019). Os fármacos administrados com mais sucesso pela via bucal são pequenos e lipofílicos por natureza ($\log P = 1,3 - 3,3$) (SMART, 2005a).

2.3.3 Modelos de avaliação de permeabilidade

2.3.3.1 *In vivo*

Apesar de algumas metodologias terem sido desenvolvidas para o estudo *in vivo* da permeabilidade bucal em humanos, estes estudos são pouco frequentes por encontrarem

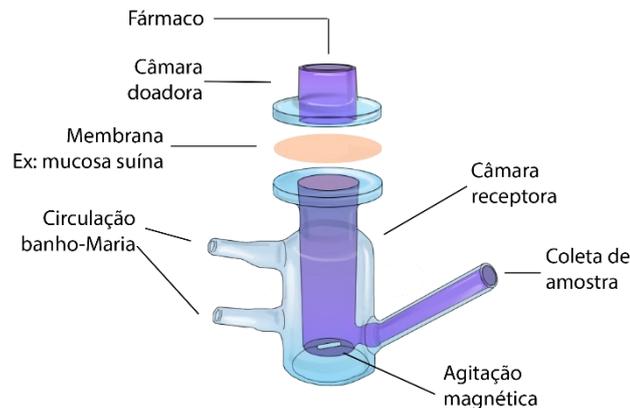
diversas limitações. Em sua forma mais simples, uma solução contendo o fármaco em questão é agitada no interior da cavidade oral dos voluntários, cerca de 60 vezes por minuto. Após um período determinado de tempo, essa solução é ejetada e recolhida, e os voluntários então enxaguam a boca com solução tampão ou água destilada. As frações do enxague também são coletadas e combinadas com a solução de fármaco expelida, e a concentração do fármaco é determinada a fim de calcular a quantidade de fármaco perdida devido a absorção oral. Ainda que simples, esta técnica oferece limitações tais como a absorção por toda a mucosa oral (não apenas na região bucal), além da possibilidade de deglutição acidental e de diluição da solução com a saliva produzida durante o teste (PINTO; PINTADO; SARMENTO, 2019). Câmaras de perfusão bucal foram desenvolvidas para tentar superar estas limitações, principalmente a absorção por toda a superfície da cavidade oral. Essas células são conectadas na mucosa bucal e uma solução contendo o fármaco circula pela câmara. A solução é coletada em diferentes períodos de tempo a fim de determinar a quantidade de fármaco perdida. No entanto, ainda existe a possibilidade de vazamento da solução de perfusão para a cavidade oral, e a quantidade de fármaco absorvida normalmente é pequena, tornando difícil a detecção do fármaco na circulação sistêmica. Nesses casos, pode-se quantificar o fármaco na saliva e este resultado pode ser extrapolado para a concentração de fármaco no plasma (ADRIAN *et al.*, 2006; PINTO; PINTADO; SARMENTO, 2019).

2.3.3.2 *Ex vivo*

As células de difusão são amplamente utilizadas para determinar a quantidade de fármaco capaz de permear a mucosa bucal e a taxa de difusão do fármaco. Nesses modelos, a mucosa bucal fresca de animais é montada em células de difusão verticais (células de Franz) ou horizontais (câmaras de Ussing). Ambos os sistemas são compostos por uma câmara doadora e uma câmara receptora, um local para coleta de amostras e um sistema de aquecimento, para manter a temperatura em 37°C (Figura 5). A mucosa bucal da espécie animal escolhida deve ser similar à mucosa humana em termos da permeabilidade, aspectos bioquímicos e morfológicos. Por essas razões, as mucosas de porcos ou coelhos são as mais utilizadas, considerando que assim como a mucosa bucal humana, também são não-queratinizadas. Por outro lado, a mucosa de coelhos possui uma área muito pequena, o que limita o seu uso (NICOLAZZO; FINNIN, 2007; PINTO; PINTADO; SARMENTO, 2019). A mucosa esofágica suína também já foi proposta como modelo para estudos de absorção bucal, pois apresenta uma

estrutura e composição lipídica e características de permeabilidade similares à mucosa bucal humana (DIAZ-DEL CONSUELO *et al.*, 2005).

Figura 5. Câmara de difusão de Franz



Fonte: Autora

Nestes estudos, o fluido da câmara receptora deve ser capaz de solubilizar adequadamente o composto estudado, mantendo as condições *sink* ao longo do tempo de experimento. Entende-se por condição *sink* aquela onde o volume do meio de dissolução é suficiente para que o soluto encontre-se em concentração cerca de 10 vezes inferior à sua concentração de saturação, não influenciando a velocidade de dissolução (AULTON; TAYLOR, 2013). Para compostos hidrofílicos, pode-se utilizar uma solução salina em pH~7,4, simulando a circulação sanguínea, porém, no caso de compostos mais lipofílicos, uma solução de base aquosa pode subestimar a absorção do fármaco (FINNIN; WALTERS; FRANZ, 2012). Para este último caso, a OECD (2011) e Finnin *et al.*, (2012) oferecem como sugestão a inclusão de etanol 50% em solução aquosa para a composição do meio receptor.

2.3.3.3 *In vitro*

Culturas de células epiteliais bucais podem também ser utilizadas para o estudo da permeabilidade de fármacos e para compreender o mecanismo de ação de promotores de absorção. As células TR146, originárias de carcinoma bucal humano, foram propostas como modelo para estudos *in vitro* tendo em vista a similaridade em termos da morfologia, função, atividade enzimática e estrutura (PINTO; PINTADO; SARMENTO, 2019). Por outro lado, há relatos que a função de barreira deste modelo é inferior a tecidos bucais humanos ou suínos

(SATTAR; SAYED; LANE, 2014). Um modelo de cultura tridimensional, derivado de queratinócitos bucais humanos saudáveis, foi desenvolvido, chamado EpiOralTM. Esse modelo possui maior similaridade a mucosa bucal humana no que se refere a estrutura, conteúdo lipídico e expressão proteica (PINTO; PINTADO; SARMENTO, 2019).

2.3.4 Promotores de absorção

Considerando que a absorção de fármacos é limitada pela barreira fisiológica presente no epitélio da mucosa bucal, alguns métodos podem ser utilizados para superar estas barreiras, facilitando a permeação de ativos através do tecido. Uma estratégia é a utilização de promotores químicos de absorção, afim de alterar as propriedades físico-químicas da barreira e abrir caminhos para a penetração do fármaco sem danificar a mucosa ou causar toxicidade (MACEDO *et al.*, 2020; NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005). Além disso, o aumento da absorção deve ser imediato e unidirecional, e o seu efeito deve ser reversível (HASSAN *et al.*, 2010). Os promotores podem aumentar a absorção pelo aumento da partição do fármaco no tecido, pela interação com domínios proteicos nas células epiteliais, pela extração de lipídeos intercelulares, ou pelo aumento da solubilidade do fármaco no veículo ou sistema de administração (MACEDO *et al.*, 2020). Diversas categorias de promotores químicos de absorção podem ser encontradas, sendo as mais conhecidas os surfactantes, sais biliares, ácidos graxos, complexos de inclusão, quelantes, polímeros, entre outros, como etanol e azona, por exemplo.

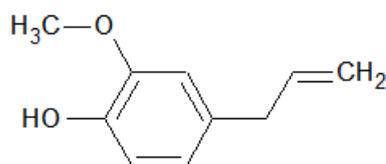
2.3.4.1 Terpenos

Apesar de poucos estudos terem sugerido o uso de terpenos de origem natural como promotores para a administração transbuccal de fármacos (SHOJAEI *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2012), seu uso na administração transdérmica já é conhecido (CHEN *et al.*, 2016). Além disto, são considerados seguros para uso farmacêutico e apresentam baixa toxicidade (THAKUR; MICHNIAK; MEIDAN, 2007). Terpenos de origem natural também são utilizados pelas indústrias de alimentos e farmacêutica como flavorizantes (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2015), o que poderia contribuir para aprimorar as características sensoriais de formulações bucais.

2.3.4.1.1 Eugenol

O eugenol (Figura 6) é um monoterpeneo que figura como principal componente do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*), apresentando-se na forma líquida à temperatura ambiente. Possui massa molecular de 164,201 g mol⁻¹ e log P de 2,2 (CHEN *et al.*, 2016). Estudos em modelo de pele abdominal murina mostraram que o eugenol em concentrações de 1 e 5% foi capaz de promover um aumento de 3 e 2,7 vezes na permeação cutânea de valsartan e de granisentrone, respectivamente. O mecanismo de aumento de absorção proposto foi a extração de lipídeos do estrato córneo e quebra de ligações de hidrogênio (AHAD; AQIL; ALI, 2016; SAOJI *et al.*, 2015). Informações sobre a citotoxicidade do eugenol ainda são limitadas e controversas (MOHAMMADI NEJAD; ÖZGÜNEŞ; BAŞARAN, 2017).

Figura 6. Estrutura química do eugenol



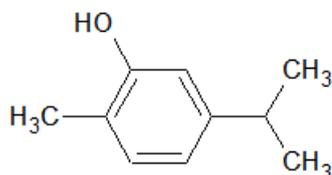
Fonte: Autora

2.3.4.1.2 Carvacrol

O carvacrol (Figura 7) é um monoterpeneo presente nos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*) e orégano (*Origanum vulgare*). É líquido a temperatura ambiente, apresenta massa molar de 150,22 g mol⁻¹ e log P de 3,28 (CHEN *et al.*, 2016). Em um estudo de permeação cutânea de corticosterona em modelo de epiderme humana utilizando carvacrol como promotor de absorção, concentrações entre 1,2 e 3,5 mM deste terpeno foram testadas. Observou-se um aumento na absorção da corticosterona entre 3,9 e 14,7 vezes, o qual mostrou ser dependente da concentração de terpeno utilizada. A fluidização dos lipídeos intercelulares do estrato córneo foi sugerida como mecanismo de aumento de absorção (CHANTASART *et al.*, 2009). Em um modelo de pele de porco recém-nascido, 5% de carvacrol foi capaz de aumentar a absorção do hormônio liberador de gonadotrofina em 112,5 vezes (SONGKRO; RADES; BECKET, 2009). Uma baixa toxicidade do carvacrol em fibroblastos foi relatada. Para uma concentração de 100 µg mL⁻¹, 26% de células não-viáveis foram encontradas

enquanto nenhuma toxicidade foi observada para a redução da concentração a metade (SOBRAL-SOUZA *et al.*, 2014).

Figura 7. Estrutura química do carvacrol

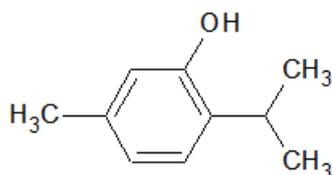


Fonte: Autora

2.3.4.1.3 Timol

O timol (Figura 8), monoterpene isômero do carvacrol, se apresenta como o componente majoritário do óleo essencial de tomilho. É sólido a temperatura ambiente, possui massa molar de 150,22 g mol⁻¹ e log P de 3,28 (CHEN *et al.*, 2016). Em concentrações entre 1,0 e 4,0 mM, em modelo de epiderme humana, este terpeno foi capaz de aumentar entre 3,1 e 17,2 vezes a permeação de corticosterona; provavelmente devido a um aumento na fluidização de lipídeos intercelulares no estrato córneo (CHANTASART *et al.*, 2009). Além disso, quando utilizado na concentração de 5%, foi capaz de aumentar em 593 vezes a permeação do meloxicam em pele de rato (CHANG *et al.*, 2007). Aydın e Türkez (2014) reportaram que o timol apresenta baixa citotoxicidade *in vitro* em células sanguíneas humanas, com redução significativa da viabilidade celular apenas em concentrações acima de 150 e 200 mg L⁻¹. Ainda, não apresenta potencial mutagênico em linfócitos humanos em concentrações de até 200 mg L⁻¹.

Figura 8. Estrutura química do timol.

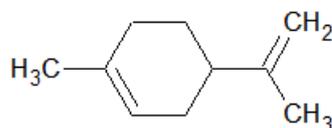


Fonte: Autora

2.3.4.1.4 Limoneno

O limoneno é um monoterpene encontrado no óleo essencial de diversas frutas cítricas, entre elas, a laranja. É líquido a temperatura ambiente, possui uma massa molar de 136,234 g mol⁻¹ e log P de 4,45 (CHEN *et al.*, 2016). Em uma concentração de 4,2% e modelo de mucosa bucal suína, aumentou em 2,62 vezes a absorção de ropinirol. Este resultado foi atribuído à fluidização dos domínios lipídicos da membrana, sugerindo que a absorção tenha ocorrido pela via transcelular (DE CARO *et al.*, 2012). A adição de 5% deste terpeno em um adesivo transdérmico contendo galantamina foi capaz de aumentar em 1,7 vezes a permeação cutânea deste fármaco. O rompimento da bicamada lipídica, assim como fluidização e extração de lipídeos do estrato córneo foram propostos como mecanismo de ação do terpeno (AMEEN; MICHNIAK-KOHN, 2019). O limoneno apresentou uma concentração citotóxica a 50% (CC₅₀) de 297 ± 2.4 µg mL⁻¹ em células Vero, o que sugere uma baixa toxicidade. Além disso, apresentou atividade tripanocida sinérgica ao BZN (MORENO *et al.*, 2018).

Figura 9. Estrutura química do limoneno



Fonte: Autora

2.4 FORMAS FARMACÊUTICAS BUCAIS

A administração de fármacos em formas farmacêuticas bucais pode ser realizada através de sistemas não-adesivos ou mucoadesivos. Comprimidos de dissolução rápida, fibras microporosas e gomas de mascar representam alguns dos principais exemplos de preparações não-adesivas. Para sistemas mucoadesivos, existem formas farmacêuticas (FFs) sólidas tais como comprimidos, *wafers*, discos e pós; semissólidas, como géis adesivos, pastas e esponjas; filmes mucoadesivos e soluções, na forma de *spray*, por exemplo (BARUA *et al.*, 2016). Além de evitarem a degradação de fármacos no trato gastrointestinal bem como o metabolismo de primeira passagem, estas FFs oferecem maior conforto ao paciente, podendo ser rapidamente removidas em caso de necessidade e serem administradas com baixas quantidades de água.

Pacientes com necessidades especiais e com dificuldade de deglutição podem ser beneficiados com este tipo de formulação (BARUA *et al.*, 2016; MORALES; MCCONVILLE, 2011; TIAN *et al.*, 2019). FFs bucais costumam apresentar alta aceitabilidade pelos pacientes, sendo que este se tornou um parâmetro chave no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, pois aumenta a adesão do paciente ao tratamento e minimiza erros na administração do medicamento (TIAN *et al.*, 2019).

2.4.1 Filmes poliméricos

Dentre as formas farmacêuticas bucais com maior destaque encontram-se os filmes poliméricos mucoadesivos, que tem sido utilizados tanto para tratamentos locais quanto sistêmicos (MONTENEGRO-NICOLINI; MORALES, 2017). São definidos como FFs compostas por uma ou múltiplas camadas, projetadas para aderir à mucosa bucal, liberando o fármaco de forma local ou sistêmica, que pode acontecer de forma rápida, controlada ou prolongada (TIAN *et al.*, 2019). Os filmes bucais possuem tamanho e espessura reduzidos em comparação a formulações bucais como comprimidos, por exemplo, sendo mais confortáveis ao paciente. Um filme ideal deve ser flexível, macio e forte o suficiente para resistir ao estresse causado pelos movimentos bucais, além de apresentar alta mucoadesão, para que consiga se manter no local de administração por períodos prolongados. Devem ser não-tóxicos, biocompatíveis e, preferencialmente, biodegradáveis (BARUA *et al.*, 2016; MANSURI *et al.*, 2016; MORALES; MCCONVILLE, 2011). Podem proporcionar uma liberação multidirecional do fármaco; incluir uma camada superior impermeável de modo a minimizar a perda de fármaco para a saliva e cavidade bucal, ou ainda, apresentar uma liberação unidirecional, onde o fármaco é liberado apenas na direção da mucosa, reduzindo perdas (CAON *et al.*, 2015).

O principal desafio na administração de fármacos pela via bucal é o tempo de residência destas formas farmacêuticas na cavidade oral, considerando que é necessário que seja mantido contato com a mucosa para a liberação do fármaco. O fluxo salivar e movimentos de mastigação, deglutição e fala podem interferir na aderência à mucosa, podendo diminuir ou até mesmo eliminar os efeitos terapêuticos esperados para o fármaco (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018).

A abordagem mecânica básica da mucoadesão envolve dois passos: o estágio de contato, onde ocorrem os fenômenos de molhagem e intumescimento pelo contato íntimo entre o polímero bioadesivo e a membrana; e o estágio de consolidação, onde ocorre a interpenetração

do polímero na superfície da mucosa (MANSURI *et al.*, 2016). A interação entre polímeros bioadesivos e a mucosa ocorre através de uma série de eventos, sendo que as teorias de adsorção e difusão são as mais importantes para a sua compreensão. A primeira estabelece que as interações adesivas entre o polímero e a mucosa podem se dar por ligações de hidrogênio, forças de van der Waals ou interações covalentes (LAFFLEUR, 2014). A teoria da difusão, por sua vez, estabelece que as moléculas mucoadesivas e as glicoproteínas do muco interagem mutuamente por meio da interpenetração de suas cadeias e formação de interações secundárias (SMART, 2005b).

Os polímeros mucoadesivos utilizados na produção de filmes bucais podem ser classificados conforme a sua carga (catiônicos e aniônicos ou sem carga), fonte (natural ou sintética), solubilidade (solúvel ou insolúvel em água) e mecanismo de ligação (eletrostática, covalente, pontes de hidrogênio, etc) (MANSURI *et al.*, 2016). A primeira geração de mucoadesivos inclui polímeros da família do ácido poli(acrílico) (Carbopol) e derivados celulósicos, tais como a hidroxipropilmetilcelulose (hipromelose ou HPMC) (MORALES; MCCONVILLE, 2011), além de pululana, alginato de sódio, quitosana e derivados de poli(acrilato) e poli(metacrilato). Polímeros tiolados, também chamados de tiômeros fazem parte da segunda geração de mucoadesivos (MONTENEGRO-NICOLINI; MORALES, 2017). Os polímeros mais utilizados na produção de filmes bucais são derivados de celulose, como o HPMC e hidroxipropilcelulose, mas o álcool polivinílico (PVAL) também é frequentemente mencionado na literatura (TIAN *et al.*, 2019). O PVAL é um polímero sintético, solúvel em água, preparado a partir da hidrólise parcial ou total de acetato de polivinila. Apresenta uma natureza elástica, não é tóxico e é biodegradável (PAVALOIU *et al.*, 2014). Suas propriedades bioadesivas em potencial acontecem através de ligações de hidrogênio (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018).

2.4.1.1 Métodos de preparo

2.4.1.1.1 Evaporação do solvente

Esta técnica, que tem sido a mais amplamente utilizada no preparo de filmes, consiste basicamente na solubilização do polímero e demais componentes do filme em um solvente adequado (ex.: água, etanol, acetona), formando uma solução homogênea, que é vertida em moldes, onde ocorre a evaporação do solvente. Após o processo de secagem, o filme pode ser

retirado do molde. Esta técnica é a mais adequada para o uso de fármacos sensíveis à temperatura, considerando que a temperatura de evaporação do solvente é baixa em comparação à necessidade de aquecimento em outras técnicas como a extrusão a quente (MONTENEGRO-NICOLINI; MORALES, 2017; TIAN *et al.*, 2019). Ao utilizar a técnica de evaporação do solvente, o comportamento de cristalização do fármaco no filme deve ser monitorado considerando a relação com a solubilidade, dissolução e uniformidade de conteúdo (TIAN *et al.*, 2019). Uma outra preocupação recorrente do uso deste método é o uso de solventes orgânicos, que podem deixar resíduos indesejáveis (MORALES; MCCONVILLE, 2011).

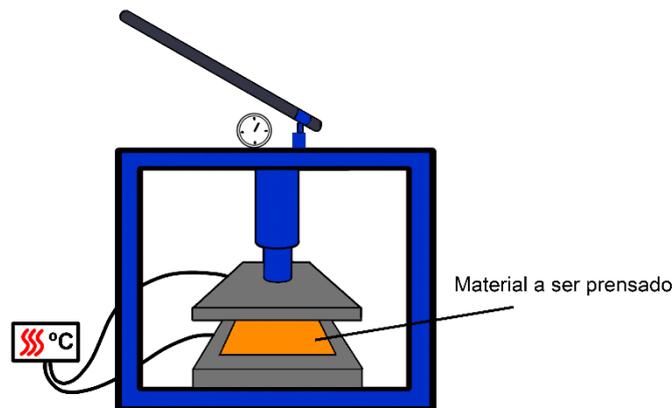
2.4.1.1.2 Extrusão à quente

Outra forma de preparo de filmes poliméricos bucais é pelo método de extrusão a quente, onde o fármaco e os excipientes são primeiramente fundidos, misturados e então forçados através de um orifício para obter um material homogêneo em diferentes formatos (MORALES; MCCONVILLE, 2011). O processo de extrusão à quente confere uma alta homogeneidade ao extrusado, garantindo FFs uniformes e altamente reprodutíveis. Além disso, evita o uso de solventes orgânicos, reduzindo preocupações em relação ao meio ambiente e a saúde. Entretanto, este processo não é indicado para substâncias termolábeis e há possibilidade de recristalização do fármaco durante o armazenamento do filme (MONTENEGRO-NICOLINI; MORALES, 2017).

2.4.1.1.3 Termoprensagem

Apesar de não ser um método utilizado na literatura para o preparo de filmes poliméricos bucais, a termoprensagem apresenta vantagens similares à técnica de extrusão à quente, apresentando curto tempo de processamento, com poucas etapas, evitando também o uso de solventes orgânicos. A técnica consiste na mistura dos materiais, que são então prensados em prensa hidráulica acoplada à um sistema de aquecimento, com temperatura suficiente para que haja a fusão dos insumos sólidos (Figura 10) (PANDEY; HASHMI; AGRAWAL, 2008).

Figura 10. Termoprensa



Fonte: Autora

2.4.1.2 Caracterização físico-química

Os filmes poliméricos bucais devem, idealmente, ser finos, flexíveis, macios, elásticos, apresentar alta estabilidade físico-química e resistir ao estresse do movimento bucal. Para isso, torna-se importante a caracterização dos mesmos a fim de averiguar as propriedades mecânicas, de hidratação e morfologia de superfície (NAIR *et al.*, 2013).

2.4.1.2.1 Força de tração e percentagem de alongamento

A análise das características mecânicas de filmes bucais é baseada nas metodologias descritas na ASTM D882-1 (ASTM INTERNATIONAL, 2012). A flexibilidade dos filmes e resistência ao rompimento determinam características sensoriais da formulação, além de garantir que os filmes não serão danificados durante o armazenamento e manuseio (TIAN *et al.*, 2019). Essas propriedades são aferidas através de ensaios mecânicos em equipamentos onde o filme é tracionado e se deforma até o seu rompimento. Os valores de força de tração e de alongamento são medidos gerando uma curva de tensão-deformação (LINDERT; BREITKREUTZ, 2017).

2.4.1.2.2 Análises térmicas

Um conjunto de análises complementares pode ser utilizado para identificar transições e interações entre os constituintes dos filmes. A análise termogravimétrica (TGA), por exemplo,

registra continuamente a massa de uma amostra em uma atmosfera controlada em função da temperatura ou do tempo, enquanto a temperatura da amostra é aumentada. É utilizada para compreender a degradação térmica de amostras, reações de desidratação e como componentes dos filmes afetam a estabilidade térmica das formulações (SAADATKHAH *et al.*, 2020).

A calorimetria diferencial exploratória (DSC), por sua vez, mede o fluxo de calor da amostra de interesse em relação a um material de referência após uma programação de temperatura (aquecimento, resfriamento ou isotérmica). Pode ser utilizada para analisar polimorfismo de constituintes da formulação (após identificação prévia por difração de raios X), reações de desidratação, assim como transição vítrea do polímero formador de filme e cristais de fármaco (PREIS *et al.*, 2013). Deslocamentos de eventos térmicos que representam esses processos são indicativos de interação entre os componentes dos filmes.

2.4.1.2.3 Difração de raios-X (DRX)

A difração de raios-X (DRX) permite analisar os padrões que evidenciam as propriedades cristalográficas das amostras. Os cristais de fármacos produzem reflexões que são apresentadas em padrões de raios-X. Se não houverem cristais presentes, ou seja, não há um ordenamento de longo alcance, apenas “halos” são visíveis (PREIS *et al.*, 2013).

2.4.1.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia no infravermelho considera as energias de transição entre estados vibracionais que ocorrem quando uma molécula absorve energia na região do infravermelho (4000–400 cm^{-1}). As massas individuais dos átomos ou dos grupos funcionais que sofrem vibração ou rotação, bem como as forças das ligações determinam a frequência (e, portanto, o comprimento de onda) da absorção no infravermelho. A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) permite identificar interações químicas fármaco-polímero e com os demais componentes do filme (MEHER *et al.*, 2016).

2.4.1.2.5 Morfologia

As imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitem adquirir informações sobre a superfícies dos filmes, bem como visualizar microestruturas e

possíveis cristais de fármacos. A falta de homogeneidade na superfície de filmes pode estar relacionada com uma baixa uniformidade de conteúdo, além de causar desconforto na utilização (LINDERT; BREITKREUTZ, 2017).

2.4.1.2.6 Teor de água

A capacidade de absorção de água está relacionada as propriedades de desintegração e mucoadesão dos filmes. Além disto, alta capacidade de absorção de água pode determinar o tipo de embalagem e condições de armazenamento dos filmes, considerando que a umidade pode afetar a estabilidade do produto/formulação final. O intumescimento pode ser analisado ao se verificar a massa da formulação antes e após a sua exposição a um determinado volume de saliva artificial. Os perfis de sorção e dessorção também podem ser determinados, permitindo avaliar a exposição do filme a diferentes umidades relativas (PREIS *et al.*, 2013).

2.4.1.2.7 Mucoadesão e tempo de residência *in vitro*

Considerando a necessidade de manter os filmes no local de administração por um período de tempo suficiente para exercer uma ação local ou sistêmica, torna-se importante analisar a força de mucoadesão entre o filme e a camada de mucina presente na mucosa bucal, bem como as características de desintegração da formulação. Métodos como texturômetro, balança modificada ou tensiômetro de superfície podem ser utilizados para a determinação da força de mucoadesão. O tempo de residência pode ser determinado fixando o filme em mucosa de origem animal (suína, por exemplo) e submetendo a amostra à um *stress* mecânico, como agitação, por exemplo (LINDERT; BREITKREUTZ, 2017).

2.4.1.2.8 Permeabilidade *ex vivo*

A permeabilidade *ex vivo* de fármacos a partir de filmes bucais pode ser avaliada utilizando tecidos de origem animal com o objetivo de simular a mucosa bucal humana. Os mais utilizados são as mucosas bucal e esofágica suínas, porém, a utilização de tecidos de outros animais tais como coelhos, galinha, ovelha e cabra já foi relatada na literatura (TIAN *et al.*, 2019). Células de Franz são utilizadas, conforme descrito anteriormente no item 2.3.3.2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUZZO, Angela; NICOLETTA, Fiore Pasquale; DALENA, Francesco; CERCHIARA, Teresa; LUPPI, Barbara; BIGUCCI, Federica. Bilayered buccal films as child-appropriate dosage form for systemic administration of propranolol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 1, p. 257–265, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.070.

ADRIAN, Charlotte L.; OLIN, Helle B. D.; DALHOFF, Kim; JACOBSEN, Jette. *In vivo* human buccal permeability of nicotine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 311, n. 1–2, p. 196–202, 2006. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.12.039.

AHAD, Abdul; AQIL, Mohd.; ALI, Asgar. The application of anethole, menthone, and eugenol in transdermal penetration of valsartan: Enhancement and mechanistic investigation. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 6, p. 1042–1051, 2016. DOI: 10.3109/13880209.2015.1100639.

AMEEN, Dina; MICHNIAK-KOHN, Bozena. Development and *in vitro* evaluation of pressure sensitive adhesive patch for the transdermal delivery of galantamine: Effect of penetration enhancers and crystallization inhibition. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 139, p. 262–271, 2019. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.04.008.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília. v. II-Monografias

ASTM INTERNATIONAL. ASTM D882: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. **ASTM Standards**, p. 12, 2012. DOI: 10.1520/D0882-12.2.

AULTON, Michael E.; TAYLOR, Kevin M. G. (ORG.). **Aulton's Pharmaceutics**. 4. ed.

AYDN, Elanur; TÜRKEZ, Hasan. *In vitro* cytotoxicity, genotoxicity and antioxidant potentials of thymol on human blood cells. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 2, p. 133–140, 2014. DOI: 10.1080/10412905.2013.860411.

AZEREDO, Camila M. O.; SOARES, Maurilio J. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 762–768, 2013. DOI: 10.1590/S0102-695X2013000500007.

BARUA, Sonia; KIM, Hyeongmin; JO, Kanghee; SEO, Chang Won; PARK, Tae Jun; LEE, Kyung Bin; YUN, Gyiae; OH, Kyungsoo; LEE, Jaehwi. Drug delivery techniques for buccal route: formulation strategies and recent advances in dosage form design. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 46, n. 7, p. 593–613, 2016. DOI: 10.1007/s40005-016-0281-9.

BERN, Caryn. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527–2534, 2011. DOI: 10.1056/NEJMct1014204.

BERN, Caryn. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015. DOI: 10.1056/NEJMra1410150.

CALDAS, Ivo S.; SANTOS, Elda G.; NOVAES, Rômulo D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797–1807, 2019. DOI: 10.1080/14656566.2019.1650915.

CAMPOS, Mônica C. O.; LEON, Leonor L.; TAYLOR, Martin C.; KELLY, John M. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 1, p. 17–19, 2014. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2014.01.002.

CAON, Thiago; JIN, Liang; SIMÕES, Cláudia M. O.; NORTON, Raymond S.; NICOLAZZO, Joseph A. Enhancing the buccal mucosal delivery of peptide and protein therapeutics. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 1, p. 1–21, 2015. DOI: 10.1007/s11095-014-1485-1.

CHANG, Jui Sheng; TSAI, Yi Hung; WU, Pao Chu; HUANG, Yaw Bin. The effect of mixed-solvent and terpenes on percutaneous absorption of meloxicam gel. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 9, p. 984–989, 2007. DOI: 10.1080/03639040601150294.

CHANTASART, Doungdaw; PONGJANYAKUL, Thaned; HIGUCHI, William I.; LI, S. Kevin. Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 10, p. 3617–3632, 2009. DOI: 10.1002/jps.21666.

CHEN, Jun; JIANG, Qiu-Dong; CHAI, Ya-Ping; ZHANG, Hui; PENG, Pei; YANG, Xi-Xiong. Natural terpenes as penetration enhancers for transdermal drug delivery. **Molecules**, v. 21, n. 12, 2016. DOI: 10.3390/molecules21121709.

CONITEC. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Doença de Chagas. Ministério da Saúde**. Brasília, 2018.

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301_suppl, p. S6–S7, 2010. DOI: 10.1038/nature09221.

CRESPILLO-ANDÚJAR, Clara; VENANZI-RULLO, Emmanuele; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio; MONGE-MAILLO, Begoña; NORMAN, Francesca; LÓPEZ-POLÍN, Ana; PÉREZ-MOLINA, José A. Safety profile of benznidazole in the treatment of chronic chagas disease: experience of a referral centre and systematic literature review with meta-analysis. **Drug Safety**. Springer International Publishing, 2018. DOI: 10.1007/s40264-018-0696-5.

DE CARO, V.; GIANDALIA, G.; SIRAGUSA, M. G.; SUTERA, F. M.; GIANNOLA, L. I. New prospective in treatment of Parkinson's disease: Studies on permeation of ropinirole through buccal mucosa. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 429, n. 1–2, p. 78–83, 2012. DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2012.03.022.

DIAS, João Carlos Pinto et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *In*:

EPIDEMIOLOGIA E SERVICOS DE SAUDE : REVISTA DO SISTEMA UNICO DE SAUDE DO BRASIL 2016, **Anais** [...]. : Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde, 2016. p. 7–86. DOI: 10.5123/S1679-49742016000500002.

DIAS, João Carlos Pinto; COURA, Jose Rodrigues; YASUDA, Maria Aparecida Shikanai. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 123–125, 2014. DOI: 10.1590/0037-8682-0248-2013.

DIAZ-DEL CONSUELO, Isabel; JACQUES, Yves; PIZZOLATO, Gian-Paolo; GUY, Richard H.; FALSON, Françoise. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 12, p. 981–987, 2005. DOI: 10.1016/J.ARCHORALBIO.2005.04.008.

DRAGICEVIC, Nina; MAIBACH, Howard I. (ORG.). **Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. DOI: 10.1007/978-3-662-47039-8.

ELEFThERiADiS, Georgios K.; RiTZOULiS, Christos; BOUROPOULOS, Nikolaos; TZETZiS, Dimitrios; ANDREADiS, Dimitrios A.; BOETKER, Johan; RANTANEN, Jukka; FATOUROS, Dimitrios G. Unidirectional drug release from 3D printed mucoadhesive buccal films using FDM technology: *In vitro* and *ex vivo* evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 144, p. 180–192, 2019. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.09.018.

Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. v. 2

FINNIN, Barrie; WALTERS, Kenneth A.; FRANZ, Thomas J. *In vitro* skin permeation methodology. *In: Topical and Transdermal Drug Delivery*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. p. 85–108. DOI: 10.1002/9781118140505.ch5.

FONSECA-SANTOS, Bruno; CHORILLI, Marlus. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their *in vivo* performance evaluation. **Materials Science and Engineering C**. Elsevier Ltd, 2018. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.022.

HASSAN, Nisreen; AHAD, Abdul; ALI, Mushir; ALI, Javed. Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 1, p. 97–112, 2010. DOI: 10.1517/17425240903338758.

HASSLOCHER-MORENO, A. M.; DO BRASIL, P. E. A. A.; DE SOUSA, A. S.; XAVIER, S. S.; CHAMBELA, M. C.; SPERANDIO DA SILVA, G. M. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 1261–1266, 2012. DOI: 10.1093/jac/dks027. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22331592>. Acesso em: 10 fev. 2019.

HEMMIGE, Vagish; TANOWITZ, Herbert; SETHI, Aisha. *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 501–508, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2011.05380.x.

HONORATO, Sara Braga; MENDONÇA, Jorge Souza; BOECHAT, Nubia; OLIVEIRA, Alcemira Conceição; MENDES FILHO, Josué; ELLENA, Javier; AYALA, Alejandro Pedro. Novel polymorphs of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benznidazole. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 389–394, 2014. DOI: 10.1016/J.SAA.2013.08.096.

LAFFLEUR, Flavia. Mucoadhesive polymers for buccal drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 5, p. 591–598, 2014. DOI: 10.3109/03639045.2014.892959.

LINDERT, Sandra; BREITKREUTZ, Jörg. Oromucosal multilayer films for tailor-made, controlled drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**. Taylor and Francis Ltd, , 2017. DOI: 10.1080/17425247.2017.1276899.

MACEDO, Ana S.; CASTRO, Pedro M.; ROQUE, Luís; THOMÉ, Natália G.; REIS, Catarina P.; PINTADO, Manuela E.; FONTE, Pedro. Novel and revisited approaches in nanoparticle systems for buccal drug delivery. **Journal of Controlled Release**. Elsevier B.V., 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.01.006.

MANSURI, Shakir; KESHARWANI, Prashant; JAIN, Keerti; TEKADE, Rakesh K.; JAIN, N. K. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**, v. 100, p. 151–172, 2016. DOI: 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2016.01.011.

MAXIMIANO, Flávia Pires; COSTA, Guilherme Hideki Yoshizane; SOUZA, Jacqueline De; CUNHA-FILHO, Marcílio Sérgio Soares Da. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1714–1719, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000800018.

MEHER, Jaya Gopal; TARAI, Magdaline; PATNAIK, Ansuman; MISHRA, Paresh; YADAV, Narayan Prasad. Cellulose buccoadhesive film bearing glimepiride: physicomechanical characterization and biophysics of buccoadhesion. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 940–950, 2016. DOI: 10.1208/s12249-015-0419-5.

MEJIA, Ana Maria; HALL, Belinda S.; TAYLOR, Martin C.; GÓMEZ-PALACIO, Andrés; WILKINSON, Shane R.; TRIANA-CHÁVEZ, Omar; KELLY, John M. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 2, p. 220–228, 2012. DOI: 10.1093/infdis/jis331.

MELLO, Francisco do Vale Chaves et al. Novel nitroimidazole derivatives evaluated for their trypanocidal, cytotoxic, and genotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 186, p. 111887, 2020. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111887.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - Rename**. 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/renome>. Acesso em: 12 fev. 2020.

MOHAMMADI NEJAD, Solmaz; ÖZGÜNEŞ, Hilal; BAŞARAN, Nurşen. Pharmacological and toxicological properties of eugenol. **The Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017. DOI: 10.4274/tjps.62207.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; ARTAZA, M. A.; MORENO, R.; PERIN, L.; ESQUISABEL, A.; PINTO, L.; PEDRAZ, J. L. Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 2017. DOI: 10.1128/AAC.01912-16.

MOLINA, I.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; TREVIÑO, B.; SERRE, N.; SAO AVILÉS, A.; ALMIRANTE, B. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6125–6131, 2015. DOI: 10.1128/AAC.04660-14.

MONTENEGRO-NICOLINI, Miguel; MORALES, Javier O. Overview and future potential of buccal mucoadhesive films as drug delivery systems for biologics. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 1, p. 3–14, 2017. DOI: 10.1208/s12249-016-0525-z.

MORALES, Javier O.; MCCONVILLE, Jason T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 187–199, 2011. DOI: 10.1016/J.EJPB.2010.11.023.

MORENO, Érika Marcela; LEAL, Sandra Milena; STASHENKO, Elena E.; GARCÍA, Liliana Torcoroma. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (cital, limonene and caryophyllene oxide). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 225, 2018. DOI: 10.1186/s12906-018-2293-7.

MORENO, Margoth; D'ÁVILA, Daniella A.; SILVA, Marcelo N.; GALVÃO, Lúcia Mc; MACEDO, Andrea M.; CHIARI, Egler; GONTIJO, Eliane D.; ZINGALES, Bianca. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility *in vitro* does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 918–24, 2010. DOI: 10.1590/s0074-02762010000700014.

NAIR, Anroop B.; KUMRIA, Rachna; HARSHA, Sree; ATTIMARAD, Mahesh; ALDHUBIAB, Bandar E.; ALHAIDER, Ibrahim A. *In vitro* techniques to evaluate buccal films. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 1, p. 10–21, 2013. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.11.019.

NICOLAZZO, Joseph A.; FINNIN, Barrie C. *In vivo* and *in vitro* models for assessing drug absorption across the buccal mucosa. *In: Drug Absorption Studies.*: Springer US, 2007. p. 89–111. DOI: 10.1007/978-0-387-74901-3_4.

NICOLAZZO, Joseph A.; REED, Barry L.; FINNIN, Barrie C. Buccal penetration enhancers—How do they really work? **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 1–2, p. 1–15, 2005. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.01.024.

OMS. **Chagas disease (American trypanosomiasis) Epidemiology**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>. Acesso em: 30 jan. 2020.

OMS. **Neglected tropical diseases**. 2020. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em: 10 fev. 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance Notes on Dermal Absorption OECD 156**. Paris. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2019.

PANDEY, G. P.; HASHMI, S. A.; AGRAWAL, R. C. Hot-press synthesized polyethylene oxide based proton conducting nanocomposite polymer electrolyte dispersed with SiO₂ nanoparticles. **Solid State Ionics**, v. 179, n. 15–16, p. 543–549, 2008. DOI: 10.1016/j.ssi.2008.04.006.

PAVALOIU, Ramona Daniela; STOICA-GUZUN, Anicuta; STROESCU, Marta; JINGA, Sorin Ion; DOBRE, Tanase. Composite films of poly(vinyl alcohol)-chitosan-bacterial cellulose for drug controlled release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 117–124, 2014. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.040.

PERDOMO, Virginia G. et al. Up-regulation of ATP-binding cassette transporters in the THP-1 human macrophage cell line by the antichagasic benznidazole. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 11, p. 707–711, 2016. DOI: 10.1590/0074-02760160080.

PERDOMO, Virginia G.; RIGALLI, Juan P.; VILLANUEVA, Silvina S. M.; RUIZ, María L.; LUQUITA, Marcelo G.; ECHENIQUE, Claudia G.; CATANIA, Viviana A. Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4894–4902, 2013. DOI: 10.1128/AAC.02531-12.

PERIN, Luísa et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 2017. DOI: 10.1128/AAC.02410-16.

PINTO, Soraia; PINTADO, Manuela E.; SARMENTO, Bruno. *In vivo*, *ex vivo* and *in vitro* assessment of buccal permeation of drugs from delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 17, n. 1, 2019. DOI: 10.1080/17425247.2020.1699913.

PREIS, Maren; WOERTZ, Christina; KLEINEBUDDE, Peter; BREITKREUTZ, Jörg. Oromucosal film preparations: Classification and characterization methods. **Expert Opinion on Drug Delivery**. Taylor & Francis, , 2013. DOI: 10.1517/17425247.2013.804058.

RAAFLAUB, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. **Arzneimittel-Forschung**, v. 30, n. 12, p. 2192–4, 1980.

RAAFLAUB, J.; ZIEGLER, W. H. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. **Arzneimittel-Forschung**, v. 29, n. 10, p. 1611–4, 1979.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol. Res.**, 2003. DOI: 10.1007/s00436-002-0754-9.

RASSI JR, Anis; RASSI, Anis; REZENDE, Joffre Marcondes De. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**. Elsevier, , 2012. DOI: 10.1016/j.idc.2012.03.002.

SAADATKHAH, Nooshin; CARILLO GARCIA, Adrián; ACKERMANN, Sarah; LECLERC, Philippe; LATIFI, Mohammad; SAMIH, Said; PATIENCE, Gregory S.; CHAOUKI, Jamal. Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA. **Canadian Journal of Chemical Engineering**. Wiley-Liss Inc., , 2020. DOI: 10.1002/cjce.23673.

SALES JUNIOR, Policarpo Ademar et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0761.

SANTOS, Fabiane Matos; CALDAS, Sérgio; DE ASSIS CÁU, Stéfany Bruno; CREPALDE, Geovam Pereira; DE LANA, Marta; MACHADO-COELHO, George L. L.; VELOSO, Vanja Maria; BAHIA, Maria Terezinha. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance *in vivo* and its modulation by *in vitro* culturing and mice infection. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 4, p. 385–390, 2008. DOI: 10.1016/j.exppara.2008.09.007.

SAOJI, Suprit D.; ATRAM, Sandip C.; DHORE, Pradip W.; DEOLE, Priya S.; RAUT, Nishikant A.; DAVE, Vivek S. Influence of the component excipients on the quality and functionality of a transdermal film formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 6, p. 1344–1356, 2015. DOI: 10.1208/s12249-015-0322-0.

SATTAR, Mohammed; SAYED, Ossama M.; LANE, Majella E. Oral transmucosal drug delivery - Current status and future prospects. **International Journal of Pharmaceutics**. Elsevier, 2014. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.05.043.

SHOJAEI, A. H.; KHAN, M.; LIM, G.; KHOSRAVAN, R. Transbuccal permeation of a nucleoside analog, dideoxycytidine: effects of menthol as a permeation enhancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 192, n. 2, p. 139–46, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00301-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00301-4).

SMART, John D. Buccal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 3, p. 507–517, 2005. a. DOI: 10.1517/17425247.2.3.507.

SMART, John D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556–1568, 2005. b. DOI: 10.1016/J.ADDR.2005.07.001.

SOBRAL-SOUZA, Celestina E. et al. Cytotoxic and antiparasitic *in vitro* activities of α -pinene and carvacrol. **Acta Toxicológica Argentina**, 2014.

SONGKRO, Sarunyoo; RADES, T.; BECKET, G. Effects of some terpenes on the *in vitro* permeation of LHRH through newborn pig skin. **Pharmazie**, v. 64, n. 2, p. 110–115, 2009. DOI: 10.1691/ph.2009.8243.

SOY, D.; ALDASORO, E.; GUERRERO, L.; POSADA, E.; SERRET, N.; MEJÍA, T.; URBINA, J. A.; GASCÓN, J. Population pharmacokinetics of benznidazole in adult patients with Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3342–3349, 2015. DOI: 10.1128/AAC.05018-14.

THAKUR, Rashmi A.; MICHNIAK, Bozena B.; MEIDAN, Victor M. Transdermal and buccal delivery of methylxanthines through human tissue *in vitro*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 5, p. 513–521, 2007. DOI: 10.1080/03639040600901994.

TIAN, Yu et al. Oromucosal films: from patient centricity to production by printing techniques. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 9, p. 981–993, 2019. DOI: 10.1080/17425247.2019.1652595.

VINUESA, Teresa et al. Benznidazole nanoformulates: A chance to improve therapeutics for Chagas disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2017. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0044.

WIENS, Matthew O.; KANTERS, Steve; MILLS, Edward; LUCANO, Alejandro A. Peregrin.; GOLD, Silvia; AYERS, Dieter; FERRERO, Luis; KROLEWIECKI, Alejandro. Systematic review and meta-analysis of the pharmacokinetics of benznidazole in the treatment of Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7035–7042, 2016. DOI: 10.1128/AAC.01567-16.

WU, Xiao; DESAI, Kashappa-Goud H.; MALLERY, Susan R.; HOLPUCH, Andrew S.; PHELPS, Maynard P.; SCHWENDEMAN, Steven P. Mucoadhesive fenretinide patches for site-specific chemoprevention of oral cancer: Enhancement of oral mucosal permeation of fenretinide by coinorporation of propylene glycol and menthol. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 937–945, 2012. DOI: 10.1021/mp200655k.

3 CAPÍTULO I – ARTIGO PUBLICADO

Este capítulo trata da avaliação da permeabilidade do BZN em mucosa bucal suína, na presença e ausência de monoterpenos, que exerceriam função como promotores de permeação. Este estudo traz também uma abordagem a respeito dos possíveis mecanismos de aumento da absorção promovido pelos monoterpenos selecionados. O produto deste capítulo é um artigo científico, que foi publicado na revista *European Journal of Pharmaceutical Sciences* em dezembro de 2019.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejps

Transbuccal delivery of benznidazole associated with monoterpenes: permeation studies and mechanistic insights

Beatriz Ribeiro Amaral, Débora Fretes Argenta, Roselene Kroth, Thiago Caon*

Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Reitor João David Ferreira Lima, s/n - Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil



ARTICLE INFO

Dedicated to Maria Silvéria Menk (in memoriam), who suffered from Chagas disease and did not have access to treatment in life.

Keywords:

Buccal permeability
Absorption enhancers
Benznidazole
Monoterpenes

ABSTRACT

Benznidazole (BZN) represents the only drug currently available for the treatment of Chagas disease in most endemic countries. When administered orally, high doses are required due to its extensive hepatic metabolism and its toxicity represents the main reason for treatment withdrawals. Because of these complications, transbuccal administration of BZN was investigated. This route avoids the first-pass hepatic metabolism and presents high permeability, with direct access to the systemic circulation. BZN was applied on porcine buccal mucosa after pretreatment with pure eugenol, carvacrol or limonene. Thermal (DSC) and spectroscopic (FT-IR) analyzes were performed to investigate the mechanisms of drug absorption enhancement. The permeability coefficient values of BZN increased 2.6, 2.9 and 4.9-fold after pretreatment with eugenol, carvacrol and limonene, respectively. The lag time, in turn, was shortened in the pretreated samples. The DSC and FT-IR analyzes suggested that transport of BZN through the buccal mucosa is associated with log P and size of monoterpenes. Limonene, the most effective absorption enhancer, contributed to greater interaction with non-polar domains of the buccal epithelium. Overall, BZN showed to be efficiently transported through the buccal route, but *in vivo* pharmacokinetic studies should be performed to confirm these findings.

1. Introduction

Approximately 8 million individuals worldwide, particularly in Latin America, are infected by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzii*, which is the etiological agent of Chagas' disease (CD). Every year, this disease is responsible for more than 10,000 reported deaths (WHO, 2018). Hematophagous insects of the Triatominae subfamily are vectors of this parasite and its transmission can occur through the ingestion, blood transfusion, congenital transmission and organ transplantation. CD is considered neglected by the World Health Organization taking into account that low-income and rural populations are the preferentially affected (Coura and Viñas, 2010). Benznidazole (BZN) is considered as the first-line treatment, and it represents the only available drug in most of the endemic countries (Perdomo et al., 2016). The drug is administered orally, in a 5–10 mg/kg/day regimen, with a maximum dose of 300 mg/day (Molina et al., 2015). BZN is rapidly absorbed through the gastrointestinal tract, reaching plasmatic concentration peaks between 3 and 4 h, with a plasmatic half-life of 12 h in humans (Molina et al., 2017). Its average relative bioavailability (oral tablet versus oral solution) is of 91.7% (Raaflaub and Ziegler, 1979). Pharmacokinetics and tissue distribution studies after oral

administration of BZN suggest a high first-pass hepatic metabolism, which would explain the limited efficacy of the drug (Perin et al., 2017). BZN is mainly metabolized by the cytochrome P450 system, generating 2-amino-imidazole and 2-hydroxy-imidazole as the main metabolites, which are excreted in the urine (Raether and Hänel, 2003). As a consequence of BZN metabolism, several metabolites are produced by the reduction of BZN nitro group, and their accumulation, interaction with other cellular components, allergic responses or the combination of these factors, may be associated with the toxic profile of this drug (Molina et al., 2015). *In vitro* assays suggest that the upregulation of P-gp and Mrp-2 proteins induced by BZN would contribute to increasing the drug efflux, explaining the decline of its therapeutic efficacy in the chronic phase of the disease (Perdomo et al., 2013). Therefore, even higher BZN doses should be considered, which would also increase the risk of toxicity. Adverse effects for this drug are common and represent the main reason for treatment withdrawal. Approximately 76% of the patients treated with BZN present some type of adverse effect (Molina et al., 2015), which include skin, gastrointestinal and nervous disorders (Hasslocher-Moreno et al., 2012). Moreover, treatment failures on the chronic phase of the disease could contribute to the selection of resistant parasites (Santos et al., 2008).

* Corresponding author.

E-mail address: thiagocaon@gmail.com (T. Caon).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105177>

Received 22 July 2019; Received in revised form 27 November 2019; Accepted 4 December 2019

Available online 05 December 2019

0928-0987/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

In view of these complications associated with BZN after an oral administration, its buccal delivery was here investigated. The buccal mucosa is characterized by low enzymatic activity, it is highly vascularized and provides direct access to the jugular vein, avoiding the first-pass hepatic metabolism. These characteristics could lead to dose reduction (Caon et al., 2015b), reducing or even avoiding toxic side effects. Additionally, the transbuccal route presents greater permeability than the transdermal route, not only due to the difference in the intercellular lipid organization, but also due to the difference in its composition (Nicolazzo et al., 2005). The fact that BZN causes skin disorders as an adverse effect represents a disadvantage for its application by the transdermal route, which justifies the choice of the buccal route. Once the most successfully delivered drugs via transbuccal route are lipophilic ($\log P = 1.3\text{--}3.3$) (Smart, 2005) and BZN presents a $\log P$ of 0.772 (Maximiano et al., 2010), the use of chemical absorption enhancers was considered in this study. Although few studies have suggested the application of naturally-occurring monoterpenes as enhancers for transbuccal delivery (Shojaei et al., 1999; Wu et al., 2012), they may be considered relatively safe and present low toxicity (Thakur et al., 2007). They are often used as flavoring agents by pharmaceutical and food industries (Dragicevic and Maibach, 2015), which could ameliorate the sensorial characteristics of buccal formulations. Eugenol, carvacrol and limonene were selected given that they are generally recognized as safe (GRAS) and due to their different $\log P$ values. Moreover, eugenol and carvacrol have shown *in vitro* activity against the epimastigote form of the parasite (present in the triatomine vector) (Azeredo and Soares, 2013; Sobral-Souza et al., 2014), whereas limonene not only increased trypanocidal activity, but also decreased by 14 times the IC_{50} of BZN on amastigote forms (tissue stage) (Moreno et al., 2018). After the permeability screening of different preparations containing BZN and monoterpenes in Franz-type diffusion cells, differential scanning calorimetry and Fourier-transform infrared spectroscopy were performed to elucidate the interaction degree of the permeation enhancers and buccal epithelium.

2. Materials and methods

2.1. Materials

BZN (99% purity) and eugenol (99%) were supplied by LAFEPE (Recife, PE, Brazil) and Biodinamica (Ibipora, PR, Brazil), respectively. Carvacrol (98%) and limonene (97%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Propylene glycol (PG) and Tween®80 (polysorbate 80) were purchased from Neon (Suzano, SP, Brazil) and CRQ (Diadema, SP, Brazil), respectively. Phosphate buffered saline (PBS) was prepared with 10.1 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , 136.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl and adjusted to pH 7.4 with 1 M HCl. Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB) was prepared with 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 25 mM $NaHCO_3$, 2.5 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.0 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5.5 mM glucose and adjusted to pH 7.4 with 1 M HCl. Methanol (MeOH) and acetonitrile were of HPLC grade and all other chemicals and reagents were of analytical grade. Water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Milford, MA, USA).

2.2. Methods

2.2.1. Thermodynamic solubility assay

Amounts of the drug in excess (250 mg) were accurately weighed and 10 mL of different solvents/solutions were added (neat PG, 50% aqueous PG solution and PBS buffer with 0.5, 1 and 2% Tween® 80) on glass vials. The flasks were shaken at 37 °C (240 rpm) for 48 h on a Novatecnica NT715 orbital shaker incubator (Piracicaba, SP, Brazil). Aliquots of each vial were filtered with 0.22 μm membranes, diluted and analyzed using the HPLC method described below.

2.2.2. Ex vivo transbuccal permeability studies

Considering the structural and enzymatic similarity of porcine buccal mucosa to human mucosa, and that both present similar permeability (Kulkarni et al., 2009), this animal tissue was selected for BZN transport studies. Porcine buccal tissue (cheek region) was obtained from a local abattoir (Antônio Carlos, SC, Brazil) immediately after slaughter and was transported in cold KRB. The adipose tissue was removed with surgical scissors and scalpel. The buccal tissue was maintained in cold KRB and used within 2 h after slaughter. Kulkarni et al., (2010) states that the porcine buccal tissue is able to maintain its permeability characteristics for up to 24 h when stored in KRB at 4 °C. The permeability assays were performed in Franz diffusion cells, which presented a diffusional area of 1.77 cm^2 . The receptor chambers were filled with 50% aqueous PG solution to maintain the skin condition and kept at 37 °C under constant magnetic stirring at 765 rpm. Pre-treatment was performed with 100 μL of either PBS buffer (control) or different penetration enhancers (undiluted eugenol, carvacrol and limonene) for 1 h. After the pre-treatment period, 2 mL of BZN solution (5 mg mL^{-1} in PG) was added to the donor chambers, diluting the penetration enhancers to a concentration final of 4.76% (v/v). A similar concentration was used in other literature studies (Ahad et al., 2011; Cui et al., 2011; Yang et al., 2013). The pretreatment approach was considered to ensure close contact between the penetration enhancer and the buccal epithelium, which allows to reducing the total experimental time. Other authors have already worked with pure terpenes in dermal permeation studies (Cal and Sznitowska, 2003) and pure essential oil in buccal absorption studies (Ceschel et al., 2000). Aliquots of 400 μL were taken from the receptor compartment every 1 h during 10 h with replenishment of fresh solution. Samples were diluted with an equal volume of acetonitrile to precipitate proteins, vortexed, centrifuged at 2,000 $\times g$ for 5 min and BZN from the supernatant was quantified by HPLC (item 2.2.4). At the end of the permeability study, the mucosa samples were placed in separated pre-weighed tubes, 3 mL of acetonitrile was added, and these flasks were kept overnight at 4 °C. After 12 h, the samples were sonicated for 15 min, centrifuged at 2,000 $\times g$ for 5 min and BZN extracted from the mucosa was analyzed by HPLC.

2.2.3. Calculations of the permeability data

The cumulative amount of drug permeated (Q_t) was calculated by the following equation (Sintov and Botner, 2006):

$$Q_t = V_r C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_s C_i \quad (1)$$

where V_r and V_s represent the volumes of the receptor solution and sample, respectively; C_t is the drug concentration on the receptor medium at each sampling time and C_i is the accumulated drug concentration at the i th time. Data were expressed as the cumulative amount of drug permeated per unit of mucosa surface area Q_t/S ($S = 1.77 \text{ cm}^2$).

The steady-state flux (J_s) was calculated from the linear slope of the cumulative amount of BZN permeated versus time. The permeability coefficient (P) was determined by the relation between J_s and the initial donor concentration ($P = J_s/C_d$). Lag time is the time required to achieve the steady-state flux, which is represented by the intercept of the regression line with the abscissa.

2.2.4. HPLC analysis

BZN was quantified by HPLC and the method was optimized to obtain a short analysis time, good resolution and adequate sensitivity based on previous studies (Morilla et al., 2005; Silva et al., 2012). Concentrations between 0.1 and 100 $\mu g \text{ mL}^{-1}$ of both samples and standard solutions were assessed by using a Perkin-Elmer Series 200 HPLC (Waltham, MA, USA), equipped with a UV detector, pump, autoinjector and online degasser. The chromatographic separation of BZN

was performed on a C18 column (Zorbax® ODS, 150 × 4.6 mm, 5 μm particle size; Agilent, Santa Clara, CA, USA) preceded by a guard column of the same packing material (KJ0-4282, Phenomenex, Torrance, CA, USA) at room temperature. The mobile phase was composed of 20 mM ammonium acetate (pH 6.5) and MeOH in a ratio of 55:45 v/v. Elution was performed isocratically at a flow rate of 1 mL min⁻¹ with a sample injection volume of 20 μL and a total sample acquisition time of 7 min. The wavelength of the detector was set to 324 nm. The method was validated according to guidelines on analytical method validation (ICH, 2005), and it showed to be linear ($r > 0.999$), precise (intraday relative standard deviation < 2.28%), accurate (recovery values ranged from 99 to 100%) and specific. The detection and quantification limits were 0.42 and 1.40 μg mL⁻¹, respectively.

2.2.5. Mechanistic studies

2.2.5.1. DSC analysis. All thermal analyses were performed in a DSC-60 equipment (Shimadzu, Kyoto, Japan). Firstly, the epithelium was carefully separated from the buccal mucosa and divided into sections of approximately 2 mg with a scalpel. A volume of 20 μL of undiluted PG, eugenol, carvacrol, limonene or BZN solution (5 mg mL⁻¹) was separately applied to the epithelium samples, considering a period of exposure similar to that of the pretreatment during the permeability assays (1 h). The treated samples and control (untreated epithelium) were sealed in aluminum hermetic pans and heated from 30 to 200 °C at a 5 °C/min rate in a nitrogen atmosphere. Changes in the enthalpy (ΔH) and corresponding mean transition temperature (T_m) values were monitored to understand lipid fluidization behavior or extraction processes as well as protein denaturation on the buccal epithelium.

2.2.5.2. FT-IR spectral analysis. Buccal epithelium was carefully separated from mucosa and divided into sections of approximately 20 mg with a scalpel. A volume of 50 μL of undiluted PG, eugenol, carvacrol, limonene or BZN solution (5 mg mL⁻¹) was separately applied to the epithelium samples, considering a period of exposure similar to that of the pretreatment during the permeability assays (1 h). FT-IR spectra of each sample were recorded in a frequency range from 600 to 4,000 cm⁻¹ on a Perkin-Elmer Frontier equipment (Waltham, USA), at room temperature, with the collection of 20 scans at a resolution of 4 cm⁻¹. Untreated buccal epithelium sample was used as a control. Data were shown as the mean spectrum of two different samples for each treatment.

2.2.6. Statistical analysis

Results were analyzed on GraphPad Prism software (version 6.01). One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for grouped analysis and unpaired t-test was used to assess the differences between two groups.

3. Results

3.1. Thermodynamic solubility assay

A solubility assay was initially performed in order to ensure the complete drug solubilization during the permeability studies. The solubility of BZN in PBS buffer (0.247 ± 0.008 mg mL⁻¹) showed a slight increase with the addition of increasing amounts of Tween®80. The solubility values were 0.257 ± 0.001; 0.274 ± 0.010 and 0.325 ± 0.002 mg mL⁻¹ at 0.5, 1 and 2% of Tween®80, respectively (Fig. 1A).

On the other hand, an increase in the solubility of BZN was observed in the presence of PG. The solubility of BZN in 50% aqueous PG solution and pure PG was 5.7 and 42-fold higher when compared to PBS alone (Fig. 1B).

OECD (2011) and Finnin et al. (2012) suggest the use of 50% aqueous ethanol solution as an option for the receptor fluid for drugs presenting low aqueous solubility, but this solvent was not used for BZN

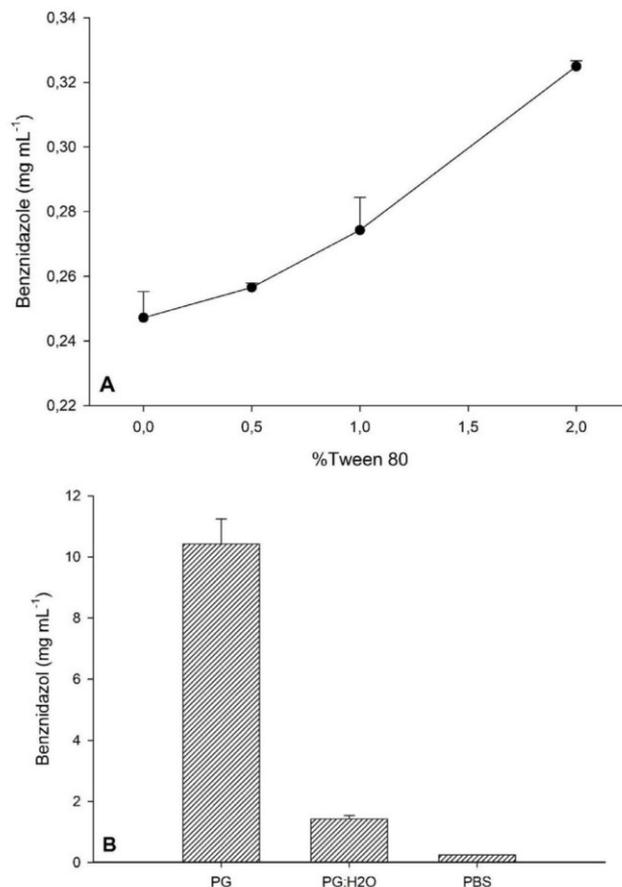


Fig. 1. (A) Benznidazole thermodynamic solubility in phosphate buffered saline with increasing concentrations of Tween®80. (B) Thermodynamic solubility of benznidazole in propylene glycol (PG); 50% PG in water (PG:H₂O) and phosphate buffered saline (PBS).

once it induced crystal growing (results not shown), as already observed in a previous study (Honorato et al., 2014). Therefore, an aqueous medium containing PG was selected as the receptor phase for the transport studies. For the donor phase, pure PG was considered once a concentration of 5 mg mL⁻¹ of BZN was applied.

3.2. Ex vivo permeability studies

A significant amount of BZN in the receptor chamber was found over the early time periods, suggesting that the buccal route could be used for its administration (Fig. 2). The flux of BZN through the buccal mucosa was $2.58 \pm 0.61 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, presenting a permeability coefficient of $5.2 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-4} \text{ cm h}^{-1}$ and a lag time of $3.66 \pm 0.43 \text{ h}$. The buccal absorption of BZN further increased after a pretreatment with monoterpenes ($p < 0.05$). The flux, permeability coefficient, and lag time values have been affected by the treatment with monoterpenes (Table 1). A shorter lag time was found for samples pretreated with monoterpenes, however, statistically significant differences were observed only for eugenol and carvacrol-treated mucosae.

For the permeability flux, an enhancement ratio (ER) of 2.6 and 2.9-fold were found after the pretreatment with eugenol and carvacrol, respectively. Limonene, in turn, enhanced the permeability flux of BZN in 4.9-fold (Table 2). The amount of BZN permeated was directly related to the drug retention in the buccal mucosa.

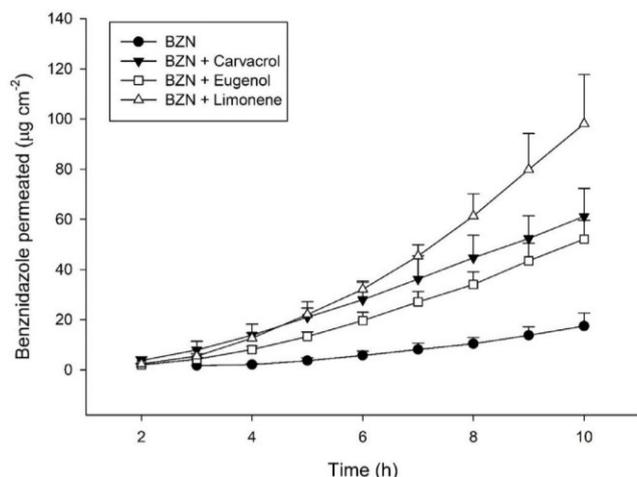


Fig. 2. Buccal permeability profile of benznidazole (5 mg mL^{-1}) alone (●) and with undiluted penetration enhancers pre-treatment through porcine buccal mucosa: eugenol (□); carvacrol (▼) and limonene (△). ($n = 6$).

3.3. Mechanistic studies

3.3.1. DSC analysis

Although DSC is a widely used technique to understand the interactions of penetration enhancers and skin constituents (Kaushik and Michniak-Kohn, 2010), few studies have considered its application to understand the thermal behavior of buccal mucosa alone (Corbo et al., 1990) or in the presence of penetration enhancers (Gandhi and Robinson, 1992). According to Gandhi and Robinson (1992) findings, lipid transitions occurs close to 69°C and protein transitions are found in temperatures above 105°C . In the stratum corneum, thermal transitions close to 65°C are ascribed to the transformation of the lamellar lipid organization to a disordered structure (Pouliot et al., 1999). The untreated epithelium was characterized by two endotherms (I and II) (Fig. 3). Endotherm I is a broad event, composed of three overlapping peaks with T_m at 52 , 61 , and 66°C (Table 3). Endotherm II, in turn, has T_m at 141°C , corresponding to a protein transition. Epithelia treated with PG and BZN/PG presented a shift of endotherm I T_m to 69 and 73°C , respectively. Limonene-treated epithelium presented endotherm I T_m at 87°C . A shift on the transition midpoint of endotherm I to lower temperatures (45°C) was observed for tissues treated with carvacrol. Endotherm I with two overlapped peaks was observed in the epithelium treated with eugenol, with a ΔH value similar to the untreated epithelium. This endotherm, with T_m at 57 and 71°C is close to that of the untreated sample. Endotherm II was affected by pretreatment with the three monoterpenes, causing a shift of the T_m to lower temperatures, especially for eugenol.

3.3.2. FT-IR analysis

The biophysical properties of the buccal epithelium, which affect the permeability flux of drugs, can be investigated by FT-IR as well as the effect of penetration enhancers on this tissue (Oh et al., 2011). The

bands corresponding to the symmetric and asymmetric CH_3 and CH_2 stretching vibrations, and the CH_2 scissoring mode, are related to the conformational order of the lipids in this layer (Schwarz et al., 2013). Amide I absorption bands ($\text{C}=\text{O}$ stretching vibrations) are associated with the secondary structure of proteins (Fig. 4A). Specific protein structures may be identified depending on the absorption spectrum. Stretching vibrations from $1,615$ and $1,638 \text{ cm}^{-1}$ are associated with β -sheeting structures, in the range of $1,638$ – $1,645 \text{ cm}^{-1}$ with random coiling structures and between $1,645$ and $1,662 \text{ cm}^{-1}$ with α -helix structures. On the other hand, no standard spectrum of amide II bands to study the frame conformation of proteins may still be found (He et al., 2009).

Both the treatments with PG and BZN/PG presented a similar IR spectrum profile, showing a shift of the amide I vibrations towards higher wavenumbers (Fig. 4B) when compared to the untreated epithelium. FT-IR band changes from $1,639$ to $1,646 \text{ cm}^{-1}$ were identified (Table 4). An increase of lipid disorder was represented by the increase of the asymmetric CH_3 stretching vibrations wavenumber. Additionally, even if the wavenumbers of the symmetric CH_2 vibrations were close to that of the control spectrum, a decrease in the band intensity was found. The lipid domains were differently affected depending on monoterpene type used in permeability assays. Limonene shifted symmetric CH_2 vibrations to higher wavenumbers ($2,856 \text{ cm}^{-1}$) whereas carvacrol slightly increased CH_2 scissoring vibrations wavenumber ($1,456 \text{ cm}^{-1}$). Eugenol-treated epithelium spectra presented a disappearance of symmetric CH_3 vibrations and the intensity loss of the symmetric CH_2 , asymmetric CH_3 and CH_2 bands.

Among the monoterpene treatments, only eugenol seems to have affected the polar protein domains. The amide I vibrations was shifted to lower wavenumbers ($1,634 \text{ cm}^{-1}$) compared to the untreated epithelium. Moreover, a slight increase of the amide vibrations wavenumber at $3,278 \text{ cm}^{-1}$ was observed. The band close to $1,515 \text{ cm}^{-1}$ is characteristic of the eugenol spectrum (Peng et al., 2015).

4. Discussion

In this study, the transbuccal route was considered for the administration of BZN in order to overcome its first-pass hepatic metabolism and reducing drug-related toxic effects. Three monoterpenes used as a flavoring in food and pharmaceutical industries and that present a known permeation enhancer effect were selected. Limonene is reported to have a trypanocidal action (selectivity index of 10.3 on amastigote forms of the parasite), and it presents lower toxicity than BZN against Vero cells (CC_{50} of $297 \pm 2.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ for limonene vs $139 \pm 2.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ for BZN). Moreover, it also demonstrated a synergistic trypanocidal action with the BZN (Moreno et al., 2018). While low toxicity on fibroblasts was reported for carvacrol (21.62% of non-viable cells at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of carvacrol and no cytotoxicity at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Sobral-Souza et al., 2014), cytotoxicity studies with eugenol are still limited and controversial (Mohammadi Nejad et al., 2017).

A relationship between ER and the amount of BZN retained in buccal mucosa may be established. The amount of drug retained in this tissue was directly and inversely associated with the lipophilicity and molecular weight of each monoterpene, respectively (Table 2).

Table 1

Permeation parameters of benznidazole (BZN) alone and with penetration enhancers pre-treatment: eugenol (EG), carvacrol (CV) and limonene (LM).

	J_s (mean \pm SD) ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	T_L (mean \pm SD) (h)	P (mean \pm SD) (cm h^{-1})
BZN	$2.58 \pm 0.61^{(a)}$	$3.66 \pm 0.43^{(a)}$	$5.2 \times 10^{-4} \pm 1.2 \times 10^{-4(a)}$
BZN/EG	$6.56 \pm 0.77^{(b)}$	$2.60 \pm 0.26^{(b)}$	$13.1 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-4(b)}$
BZN/CV	$7.47 \pm 0.99^{(b)}$	$2.07 \pm 0.48^{(b)}$	$14.9 \times 10^{-4} \pm 2.0 \times 10^{-4(b)}$
BZN/LM	$12.53 \pm 2.39^{(c)}$	$2.84 \pm 0.39^{(a,b)}$	$25.1 \times 10^{-4} \pm 4.8 \times 10^{-4(c)}$

One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$) ($n = 6$). Different letters indicate significant difference among treatments. J_s = flux; T_L = lag time; P = permeability coefficient.

Table 2
BZN buccal mucosal retention, BZN permeated and enhancement ratio; physicochemical properties of the monoterpenes.

Enhancer	Buccal mucosal retention (%)	BZN permeated (%)	ER	LogP ^d	MW ^d	BP ^d	Polar surface area (Å ²) ^e
Control	1.7 ± 0.4	0.3 ± 0.1	-	-	-	-	-
Eugenol	3.1 ± 0.5 ^b	0.9 ± 0.1 ^a	2.6	2.20	164.201	255.0	29.46
Carvacrol	3.4 ± 0.9 ^a	1.1 ± 0.2 ^b	2.9	3.28	150.220	237.7	20.23
Limonene	5.3 ± 0.8 ^c	1.7 ± 0.4 ^b	4.9	4.45	136.234	175.4	0

ER = Enhancement ratio; MW = molecular weight; BP = boiling point.

^a Unpaired t-test ($n = 6$) ($p < 0.05$)

^b Unpaired t-test ($n = 6$) ($p < 0.01$)

^c Unpaired t-test ($n = 6$) ($p < 0.001$)

^d (Chen et al., 2016)

^e (CHEMAXON)

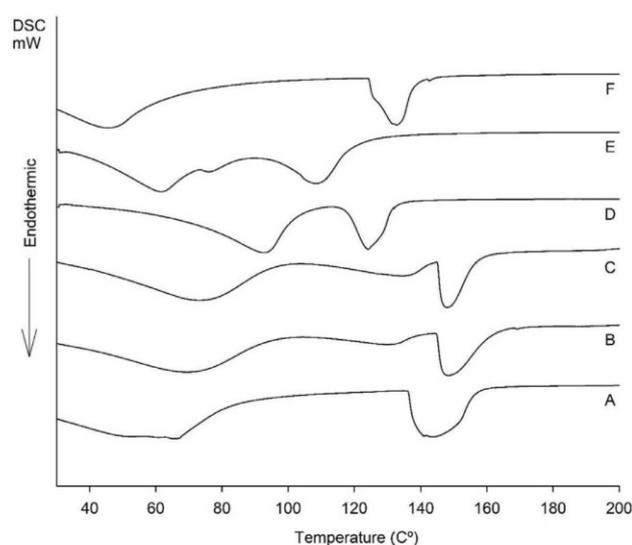


Fig. 3. Thermograms of untreated porcine buccal epithelium/control (A), and epithelium treated with propylene glycol (B); benznidazole in propylene glycol (5 mg m L⁻¹) (C); limonene (D); eugenol (E) and carvacrol (F). ($n = 2$).

Table 3
Effect of propylene glycol (PG), benznidazole in propylene glycol (BZN/PG), and neat monoterpenes [eugenol (EG), carvacrol (CV) and limonene (LM)] at the transition midpoint temperature (T_m) and enthalpy (ΔH) of the main thermal transitions of the porcine buccal epithelium ($n = 2$)

	Endotherm I		Endotherm II	
	T_m (°C)	ΔH (kJ g ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH (J g ⁻¹)
Untreated epithelium	52.48/60.83/66.37	0.46	141.32	1.36
Epithelium + PG	68.84	0.33	147.64	0.54
Epithelium + BZN/PG	73.12	0.40	146.09	0.74
Epithelium + LM	87.01	0.90	121.66	1.28
Epithelium + EG	56.62/70.95	0.46	107.76	1.31
Epithelium + CV	45.53	0.25	130.08	1.18

Although all pretreatment approaches reduced the lag time values, only carvacrol and eugenol were statistically different from control. The low molar mass of the drug led to the rapid diffusion of BZN through the mucosa, which reduce the impact of penetration enhancers on this parameter.

The endotherms found for the untreated epithelium corresponded to the temperatures already reported in previous studies (Gandhi and Robinson, 1992). Endotherm I was characterized by a thermal broad event, presenting three overlapped peaks. Phospholipids can exhibit three main groups of phase transitions, not always detectable,

presenting asymmetric thermograms (Chiu and Prenner, 2011). They represent the main lipid constituents in the porcine buccal epithelium (Diaz-del Consuelo et al., 2005). This sustains the hypothesis that endotherm I is related to lipid transitions, and mainly, phospholipids. The epithelia treated with PG and BZN/PG presented a shift of endotherm I to higher temperatures. The dehydration of the sample, which can be caused by the hygroscopic characteristics of PG, may be related to the shift of this endotherm since reduced water amounts are associated with increased lipid order and T_m (Golden et al., 1987). The epithelium treated with limonene presented the endotherm I transition at a higher temperature, with an increase of approximately two-fold in the enthalpy (ΔH) when compared to the untreated epithelium. This peak coincides with the evaporation event of limonene (Khoshakhlagh et al., 2017), which suggests there was a peak overlap with the lipid transition endotherm. A shift on the transition midpoint of endotherm I to lower temperatures, associated with the disruption of epithelium lipid bilayers (Caon et al., 2015a) was observed for carvacrol-treated tissues treated. The reduction in ΔH value for this sample can be related to lipid fluidization (Kaushik and Michniak-Kohn, 2010). All monoterpenes, particularly the eugenol, caused a shift of endotherm II transition midpoint (related to protein transitions and denaturation) to lower temperatures.

PG and BZN/PG-treated epithelia FT-IR spectra presented a shift of amide I band, which suggest the prevalence of an α -helix secondary protein structure for these samples. Moreover, these samples presented a certain degree of lipid disorder. While limonene and carvacrol spectra suggested a higher degree of lipid disorder and fluidization, eugenol treated tissues seemed to reduce the intensity of lipid-related bands, suggesting that this monoterpene caused limited lipid extraction. Eugenol shifted amide I vibrations to lower wavenumbers, corresponding to a protein secondary structure of β -sheet, while the untreated epithelium values are associated with a random coil structure. Also, a shift in amide of proteins vibrations to higher wavenumbers suggests a higher degree of order in the protein domains of eugenol-treated samples.

Among the tested permeability enhancers, limonene is the most lipophilic compound (see the polar surface area at Table 2), a characteristic that can facilitate its penetration into the lipid membrane and increase fluidity (Mendanha and Alonso, 2015). As a consequence, an increased BZN retention and flux through the buccal mucosa are observed, possibly by improving the transcellular route (De Caro et al., 2012). FT-IR analysis of limonene-treated epithelium corroborates with these findings given that this excipient affected the lipid domains more significantly. Both lipid disorder and fluidization were higher for limonene-treated tissues than the untreated epithelium. Epithelial membrane lipid domains were also affected by the carvacrol treatment, which caused thermal changes related with lipid disruption whereas FT-IR analysis suggested an increased fluidization. For eugenol, in turn, the thermogram presented a similar lipid transition profile when compared to the untreated epithelium, whereas protein transitions were more affected. The protein secondary structure profile

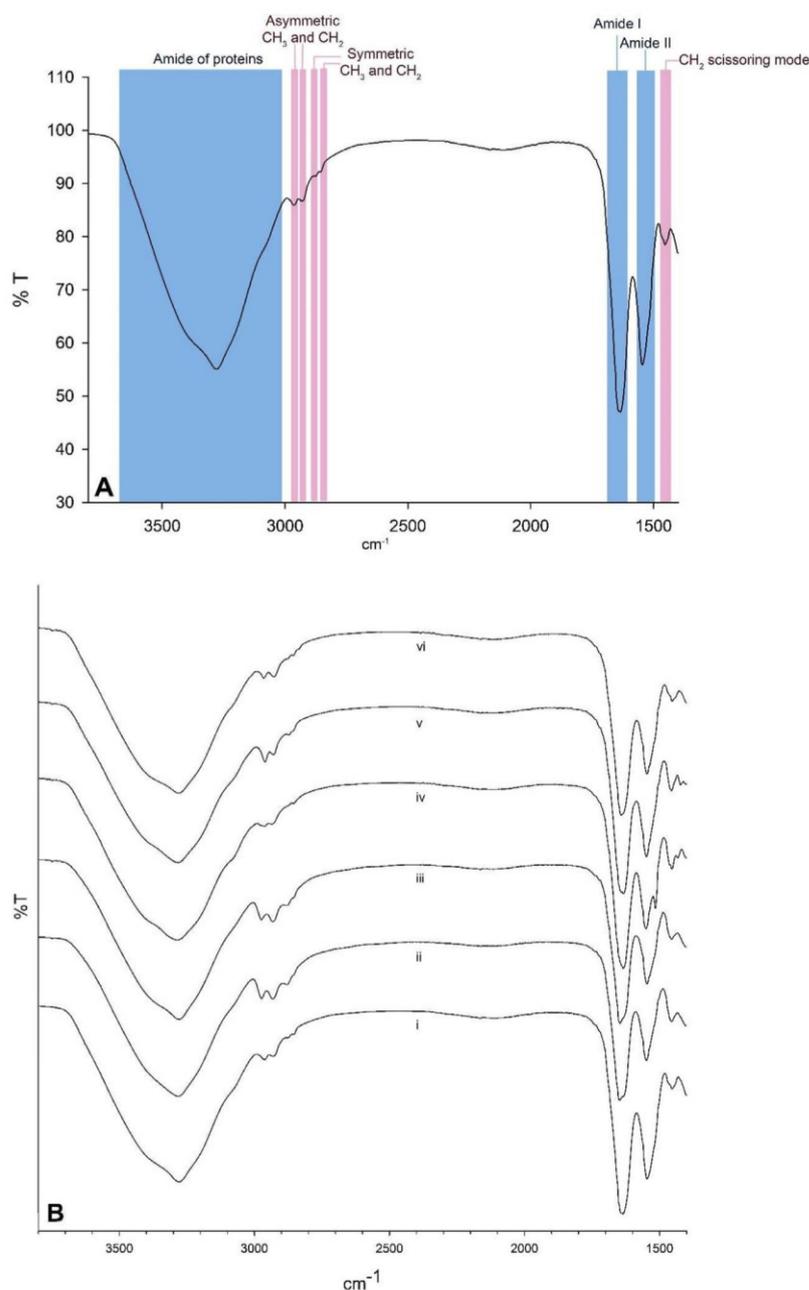


Fig. 4. (A) Schema of FT-IR analysis interpretation. Blue bands are related to protein structures and pink band are related to lipid structures. (B) FT-IR spectra of untreated porcine buccal epithelium (i) and treated with propylene glycol (ii); benznidazole in propylene glycol (5 mg m L^{-1}) (iii); eugenol (iv); carvacrol (v) and limonene (vi). ($n = 2$).

also seems to have been affected by eugenol. The interaction of eugenol with protein domains can be explained by the more polar nature of this monoterpene. Eugenol-protein interactions have already been reported in previous studies (Dubey et al., 2017; Singh et al., 2016).

Overall, the mechanistic studies (DSC and FT-IR analysis) suggest that the transport of BZN through porcine buccal mucosa was associated with monoterpene log P and size. The polar protein domains were more affected by eugenol, the larger and more polar monoterpene used in this study. On the other hand, limonene, the smaller and more lipophilic enhancer, displayed greater interaction with non-polar domains and provided higher ER value, which sustains the hypothesis that BZN would be transported via the transcellular route.

Based on these findings, limonene would be the most appropriate

excipient to be included in BZN transbuccal formulations. This monoterpene also can act synergistically with BZN against the intracellular parasite form and is a flavoring agent able to ameliorate the sensorial characteristics of buccal formulations improving the patient compliance. Assessment of BZN permeability using isolated epithelium as well as bioavailability studies would be of interest to confirm our findings.

5. Conclusion

The transbuccal delivery represents a promising alternative to BZN administration in comparison with the oral route, with the possibility to reduce BZN dose and thus the toxic adverse events. The use of

Table 4

Permeation enhancers effect in the buccal epithelium structure on FT-IR spectrum wavenumbers. (n = 2)

	Amide of proteins	Asymm. CH ₃	Symm. CH ₃	Asymm. CH ₂	Symm. CH ₂	Amide I and II	CH ₂ sciss.
Untreated epithelium	3278.85 ± 1.87	2963.01 ± 0.40	2876.75 ± 0.10	2931.33 ± 4.14	2854.65 ± 0.48	1639.21 ± 0.24 1545.31 ± 1.73	1453.73 ± 0.14
Epithelium + PG	3281.65 ± 0.27	2973.01 ± 3.86	2880.15 ± 5.36	2932.41 ± 3.58	2853.82 ± 0.51	1646.93 ± 5.11 1548.23 ± 2.60	1455.01 ± 0.25
Epithelium + BZN/PG	3279.97 ± 1.17	2973.71 ± 3.78	2880.71 ± 4.92	2931.99 ± 5.20	2853.13 ± 1.65	1646.27 ± 3.65 1546.19 ± 3.51	1454.77 ± 0.27
Epithelium + EG	3284.13 ± 7.75	2962.87 ± 3.82	-	2935.97 ± 1.36	2855.71 ± 0.69	1634.07 ± 3.54 1549.71 ± 3.62	1453.69 ± 0.82
Epithelium + CV	3282.87 ± 5.02	2960.35 ± 1.99	2872.83 ± 4.36	2929.13 ± 5.01	2854.69 ± 0.24	1639.35 ± 5.98 1548.01 ± 3.96	1456.05 ± 1.70
Epithelium + LM	3280.63 ± 2.21	2964.95 ± 0.10	2877.82 ± 0.35	2926.85 ± 4.71	2856.25 ± 0.49	1641.41 ± 2.76 1546.63 ± 1.99	1452.83 ± 0.85

monoterpenes demonstrated to increase the buccal absorption of BZN, which was directly related to the lipophilicity of the enhancer. Limonene, the most lipophilic monoterpene used in this study, was more effective as penetration enhancer than carvacrol and eugenol. The use of limonene as an excipient can be further explored, since it has already demonstrated a synergistic trypanocidal activity with BZN against the parasite and it also is used as a flavoring agent in pharmaceutical and food industries.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Brazilian governmental agencies CNPq/MCTI(Universal 01/2016 - Grant number: 408229/2016-0) and CAPES/MEC for financial support for this project and for student scholarships. The authors would like to thank Laboratório de Controle de Qualidade (UFSC) for the technical support (DSC and FT-IR analyses). We also thank LAFEPE/PE and Biodynamic for the donation of BZN and eugenol, respectively.

References

- Ahad, A., Aqil, M., Kohli, K., Sultana, Y., Mujeeb, M., Ali, A., 2011. Role of novel terpenes in transcutaneous permeation of valsartan: effectiveness and mechanism of action. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37, 583–596. <https://doi.org/10.3109/03639045.2010.532219>.
- Azeredo, C.M.O., Soares, M.J., 2013. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Cnithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. *Rev. Bras. Farmacogn.* 23, 762–768. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500007>.
- Cal, K., Sznitowska, M., 2003. Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes—*in vitro* studies. *J. Control. Release* 93, 369–376. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2003.09.002>.
- Caon, T., Campos, C.E.M., Simões, C.M.O., Silva, M.A.S., 2015a. Novel perspectives in the tuberculosis treatment: administration of isoniazid through the skin. *Int. J. Pharm.* 494, 463–470. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2015.08.067>.
- Caon, T., Jin, L., Simões, C.M.O., Norton, R.S., Nicolazzo, J.A., 2015b. Enhancing the buccal mucosal delivery of peptide and protein therapeutics. *Pharm. Res.* 32, 1–21. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1485-1>.
- Ceschel, G.C., Maffei, P., Moretti, M.D.L., Demontis, S., Peana, A.T., 2000. *In vitro* permeation through porcine buccal mucosa of *Salvia desoleana* Atzei & Picci essential oil from topical formulations. *Int. J. Pharm.* 195, 171–177. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00381-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00381-6).
- Chiu, M.H., Prenner, E.J., 2011. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3, 39–59. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76463>.
- Corbo, D.C., Liu, J.C., Chien, Y.W., 1990. Characterization of the barrier properties of mucosal membranes. *J. Pharm. Sci.* 79, 202–206.
- Coura, J.R., Viñas, P.A., 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465, S6–S7. <https://doi.org/10.1038/nature09221>.
- Cui, Y., Li, L., Zhang, L., Li, J., Gu, J., Gong, H., Guo, P., Tong, W., 2011. Enhancement and mechanism of transdermal absorption of terpene-induced propranolol hydrochloride. *Arch. Pharm. Res.* 34, 1477–1485. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0909-2>.
- De Caro, V., Giandalia, G., Siragusa, M.G., Sutura, F.M., Giannola, L.I., 2012. New prospective in treatment of Parkinson's disease: studies on permeation of ropinirole through buccal mucosa. *Int. J. Pharm.* 429, 78–83. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2012.03.022>.
- Diaz-del Consuelo, I., Jacques, Y., Pizzolato, G.P., Guy, R.H., Falson, F., 2005. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Arch. Oral Biol.* 50, 981–987. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2005.04.008>.
- dos Santos, F.M., Caldas, S., de Assis Cáu, S.B., Crepalde, G.P., de Lana, M., Machado-Coelho, G.L.L., Veloso, V.M., Bahia, M.T., 2008. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benzimidazole resistance *in vivo* and its modulation by *in vitro* culturing and mice infection. *Exp. Parasitol.* 120, 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.09.007>.
- Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. In: Dragicevic, N., Maibach, H.I. (Eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8>.
- Dubey, K., Anand, B.G., Shekhawat, D.S., Kar, K., 2017. Eugenol prevents amyloid formation of proteins and inhibits amyloid-induced hemolysis. *Sci. Rep.* 7, 40744. <https://doi.org/10.1038/srep40744>.
- Finnin, B., Walters, K.A., Franz, T.J., 2012. *In vitro* Skin Permeation Methodology, in: *Topical and Transdermal Drug Delivery*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 85–108. <https://doi.org/10.1002/9781118140505.ch5>.
- Gandhi, R., Robinson, J., 1992. Mechanisms of penetration enhancement for transbuccal delivery of salicylic acid. *Int. J. Pharm.* 85, 129–140. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90142-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90142-0).
- Golden, G.M., Guzek, D.B., Kennedy, A.E., McKie, J.E., Potts, R.O., 1987. Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties. *Biochemistry* 26, 2382–2388. <https://doi.org/10.1021/bi00382a045>.
- Hasslocher-Moreno, A.M., do Brasil, P.E.A.A., de Sousa, A.S., Xavier, S.S., Chambela, M.C., Sperandio da Silva, G.M., 2012. Safety of benzimidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1261–1266. <https://doi.org/10.1093/jac/dks027>.
- He, W., Guo, X., Xiao, L., Feng, M., 2009. Study on the mechanisms of chitosan and its derivatives used as transdermal penetration enhancers. *Int. J. Pharm.* 382, 234–243. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2009.07.038>.
- Honorato, S.B., Mendonça, J.S., Boechat, N., Oliveira, A.C., Mendes Filho, J., Ellena, J., Ayala, A.P., 2014. Novel polymorphs of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benzimidazole. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 118, 389–394. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2013.08.096>.
- ICH, 2005. *Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2 (R1)*. ICH Harmon. Tripart. Guidel.
- Kaushik, D., Michniak-Kohn, B., 2010. Percutaneous penetration modifiers and formulation effects: thermal and spectral analyses. *AAPS PharmSciTech* 11, 1068–1083. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9469-x>.
- Khoshkhalgh, K., Koocheki, A., Mohebbi, M., Allafchian, A., 2017. Development and characterization of electrospayed *Alyssum homolocarpum* seed gum nanoparticles for encapsulation of D-limonene. *J. Colloid Interface Sci* 490, 562–575. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2016.11.067>.
- Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, I., Li, X., Jasti, B., 2010. Porcine buccal mucosa as *in vitro* model: effect of biological and experimental variables. *J. Pharm. Sci.* 99, 1265–1277. <https://doi.org/10.1002/jps.21907>.
- Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, S.I., Li, X., Jasti, B., 2009. Porcine buccal mucosa as an *in vitro* model: Relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers. *J. Pharm. Sci.* 98, 471–483. <https://doi.org/10.1002/jps.21436>.
- Maximiano, F.P., Costa, G.H.Y., De Souza, J., Da Cunha-Filho, M.S.S., 2010. Physicochemical characterization of antichagasic benzimidazole. *Quim. Nova* 33, 1714–1719. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000800018>.
- Mendonça, S.A., Alonso, A., 2015. Effects of terpenes on fluidity and lipid extraction in phospholipid membranes. *Biophys. Chem.* 198, 45–54. <https://doi.org/10.1016/J.BPC.2015.02.001>.
- Mohammadi Nejad, S., Özgüneş, H., Başaran, N., 2017. Pharmacological and toxicological properties of eugenol. *Turkish J. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.4274/tjps.62207>.
- Molina, I., Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A., Artaza, M.A., Moreno, R., Perin, L.,

- Esquisabel, A., Pinto, L., Pedraz, J.L., 2017. Pharmacokinetics of benznidazole in healthy volunteers and implications in future clinical trials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61. <https://doi.org/10.1128/AAC.01912-16>.
- Molina, I., Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A., Treviño, B., Serre, N., Sao Avilés, A., Almirante, B., 2015. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 6125–6131. <https://doi.org/10.1128/AAC.04660-14>.
- Moreno, É.M., Leal, S.M., Stashenko, E.E., García, L.T., 2018. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). *BMC Complement. Altern. Med.* 18, 225. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2293-7>.
- Morilla, M.J., Prieto, M.J., Romero, E.L., 2005. Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 213–219. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000200017>.
- Nicolazzo, J.A., Reed, B.L., Finnin, B.C., 2005. Buccal penetration enhancers—How do they really work? *J. Control. Release* 105, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.01.024>.
- Oh, D.-H., Chun, K.-H., Jeon, S.-O., Kang, J.-W., Lee, S., 2011. Enhanced transbuccal salmon calcitonin (sCT) delivery: Effect of chemical enhancers and electrical assistance on *in vitro* sCT buccal permeation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.05.010>.
- Organisation for Economic Co-operation and Development, 2011. *Guidance Notes on Dermal Absorption*. OECD 156, Paris.
- Peng, S., Zou, L., Liu, Wei, Gan, L., Liu, Weilin, Liang, R., Liu, C., Niu, J., Cao, Y., Liu, Z., Chen, X., 2015. Storage stability and antibacterial activity of eugenol nanoliposomes prepared by an ethanol injection–dynamic high-pressure microfluidization method. *J. Food Prot.* 78, 22–30. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-246>.
- Perdomo, V.G., Rigalli, J.P., Luquita, M.G., Pellegrino, J.M., Ruiz, M.L., Catania, V.A., 2016. Up-regulation of ATP-binding cassette transporters in the THP-1 human macrophage cell line by the antichagasic benznidazole. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111, 707–711. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160080>.
- Perdomo, V.G., Rigalli, J.P., Villanueva, S.S.M., Ruiz, M.L., Luquita, M.G., Echenique, C.G., Catania, V.A., 2013. Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4894–4902. <https://doi.org/10.1128/AAC.02531-12>.
- Perin, L., Moreira da Silva, R., Fonseca, K., da S., Cardoso, J.M., de, O., Mathias, F.A.S., Reis, L.E.S., Molina, I., Correa-Oliveira, R., Vieira, P.M., de, A., Carneiro, C.M., 2017. Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61. <https://doi.org/10.1128/AAC.02410-16>.
- Pouliot, R., Germain, L., Auger, F.A., Tremblay, N., Juhasz, J., 1999. Physical characterization of the stratum corneum of an *in vitro* human skin equivalent produced by tissue engineering and its comparison with normal human skin by ATR-FTIR spectroscopy and thermal analysis (DSC). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1439, 341–352. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00086-4).
- Raaflaub, J., Ziegler, W.H., 1979. Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung* 29, 1611–1614.
- Raether, W., Hänel, H., 2003. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0754-9>.
- Schwarz, J.C., Pagitsch, E., Valenta, C., 2013. Comparison of ATR-FTIR spectra of porcine vaginal and buccal mucosa with ear skin and penetration analysis of drug and vehicle components into pig ear. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.020>.
- Shojaei, A.H., Khan, M., Lim, G., Khosravan, R., 1999. Transbuccal permeation of a nucleoside analog, dideoxycytidine: effects of menthol as a permeation enhancer. *Int. J. Pharm.* 192, 139–146. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00301-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00301-4).
- Silva, R.M.Da, Oliveira, L.T., Márcia, N., Barcellos, S., De Souza, J., De Lana, M., 2012. Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.05785-11>.
- Singh, P., Jayaramaiah, R.H., Agawane, S.B., Vannuruswamy, G., Korwar, A.M., Anand, A., Dhaygude, V.S., Shaikh, M.L., Joshi, R.S., Boppana, R., Kulkarni, M.J., Thulasiram, H.V., Giri, A.P., 2016. Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: Proteomic and mechanistic insights. *Sci. Rep.* 6, 18798. <https://doi.org/10.1038/srep18798>.
- Sintov, A.C., Botner, S., 2006. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int. J. Pharm.* 311, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.019>.
- Smart, J.D., 2005. Buccal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 507–517. <https://doi.org/10.1517/17425247.2.3.507>.
- Sobral-Souza, C.E., Alencar, L.B.B., Matias, E.F.F., Freitas, M.A., Ferreira, J.V.A., Albuquerque, R.S., Lavor, A.K.L.S., Brito, D.I.V., Leite, N.F., Andrade, J.C., Coutinho, H.D.M., Vega, C., Moraes-Braga, M.F.B., Tintino, S.R., 2014. Cytotoxic and anti-parasitic *in vitro* activities of α -pinene and carvacrol. *Acta Toxicológica Argentina*.
- Thakur, R.A., Michniak, B.B., Meidan, V.M., 2007. Transdermal and buccal delivery of methylxanthines through human tissue *in vitro*. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33, 513–521. <https://doi.org/10.1080/03639040600901994>.
- WHO, 2018. Chagas disease (American trypanosomiasis) Epidemiology [WWW Document]. WHO URL. <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/> accessed 2.6.19.
- Wu, X., Desai, K.-G.H., Mallery, S.R., Holpuch, A.S., Phelps, M.P., Schwendeman, S.P., 2012. Mucoadhesive fenretinide patches for site-specific chemoprevention of oral cancer: enhancement of oral mucosal permeation of fenretinide by incorporation of propylene glycol and menthol. *Mol. Pharm.* 9, 937–945. <https://doi.org/10.1021/mp200655k>.
- Yang, Z., Teng, Y., Wang, H., Hou, H., 2013. Enhancement of skin permeation of bufalin by limonene via reservoir type transdermal patch: formulation design and biopharmaceutical evaluation. *Int. J. Pharm.* 447, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.048>.

4 CAPÍTULO II – ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA AVALIAÇÃO

Este capítulo trata do desenvolvimento e caracterização de filmes de polivinil álcool visando a liberação bucal do BZN. Os filmes foram preparados pela técnica de termoprensagem e, na etapa de caracterização físico-química, consideraram-se análises espectroscópicas, cristalográficas, morfológicas, assim como estudos das propriedades mecânicas, térmicas, sorção de água e estudos de permeabilidade em mucosa esofágica. O produto deste capítulo é um artigo científico, que será submetido para apreciação na revista *European Polymer Journal*.

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF THERMO-PRESSED
POLYVINYL ALCOHOL FILMS FOR BUCCAL DELIVERY OF BENZNIDAZOLE**

Beatriz Ribeiro do Amaral^a, Rodrigo Henrique Saatkamp^b, Adalberto Enumo Junior^b,
Roselene Kroth^a, Débora Fretes Argenta^a, Elisa Regina Lazzarotto Rebelatto^a, Gabriela
Schneider Rauber^a, Alexandre Luis Parize^b, Thiago Caon^{a*}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus
Reitor João David Ferreira Lima, s/n - Trindade, Florianópolis - SC, 88040-900, Brazil.

^b Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Campus Reitor João David
Ferreira Lima, s/n - Trindade, Florianópolis - SC, 88040-900, Brazil.

*Corresponding author: thiagocaon@gmail.com

To be submitted in Materials Science & Engineering: C (FI=5.880)

ABSTRACT

Given that oral preparations of benznidazole (BZN) have demonstrated limited efficacy in the treatment of Chagas' disease due to pharmacokinetic or toxicological problems, the development of buccal polymeric films was purposed in this study. These systems ensure high patient acceptability and direct access to the systemic circulation, improving drug bioavailability and toxicological profile. Polymer films were prepared through a thermopressing method by mixing BZN and polyvinyl alcohol (PVAL). In some preparations, propylene glycol (PG) and thymol (TM) were also included as plasticizer and chemical absorption enhancer, respectively. Morphology, X-ray diffraction, spectroscopic, thermal, mechanical, and water uptake properties as well as *ex vivo* permeability studies were performed to characterize the film formulations physicochemically. BZN remained stable and in an amorphous form over 90 days. The addition of PG and TM improved the mechanical properties of the films, making them soft, flexible and tear-resistant. Also, these additives increased the water sorption rate of the films at 50 and 75% relative humidity and the TM increased the film erosion properties and drug permeability (close to 6x) compared to control. It was hypothesized that the permeability improvement of thymol-based films that follow a drug release profile through erosion is also associated with the inhibition of BZN crystallization when the film is in contact with the buccal mucosa. Once the thymol has previously demonstrated a significant *in vivo* and *in vitro* trypanocidal action and even improved the film characteristics, these systems may be considered promising for Chagas' disease treatment.

Keywords: buccal drug delivery; polymeric films; thermopress; benznidazole; thymol; polyvinyl alcohol.

1 INTRODUCTION

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease (CD), is responsible for more than 10,000 reported deaths per year [1], particularly in Latin American countries. CD is considered neglected by the World Health Organization, taking into account that low-income and rural populations are more affected [2]. Benznidazole (BZN) is considered the first-line treatment for CD, and represents the only available drug in most of the endemic countries [3]. BZN is administered orally, however, the drug undergoes a high first-pass hepatic metabolism after oral administration, which may explain its limited efficacy [4]. As a consequence, high BZN doses are used, which may be related to the manifestation of several adverse effects, the main reason for treatment withdrawal [5]. Moreover, treatment failures on the chronic phase of the disease could contribute to the selection of resistant parasites [6].

Novel drug delivery systems are being explored aiming to enhance the bioavailability of drugs and reduce their side effects. In recent years, oromucosal films have received more attention to treating both local and systemic diseases [7–9]. These novel dosage forms could then be further explored to BZN delivery on an alternative administration route such as the transbuccal mucosa. This tissue is highly vascularized and provides direct access to the jugular vein, avoiding first-pass hepatic metabolism [10], which could allow to reducing the dosage and toxic side-effects. Buccal mucoadhesive films are defined as single or multilayered pharmaceutical dosage forms, which are designed to attach to the buccal mucosa, releasing the drug for local or systemic action, either on a rapid onset, a controlled or a delayed drug delivery. These systems are characterized by high patient acceptability, which has become a key parameter to guide drug product development [8]. The film formulations present reduced size and thickness, are easy to transport and handle, easily removable if needed, can be administered without water, and are suitable for patients that present difficulties to swallow [8,11,12]. An ideal film formulation should be flexible, soft and strong enough to resist the stress from mouth movements. They also should present a strong mucoadhesion ability and be non-toxic, biocompatible and preferentially biodegradable [11,12]. Although different methods are available for film preparation [8,11], the thermopressing method has been underexplored for pharmaceutical dosage forms. This technique presents similar advantages as the hot-melt extrusion method, having a short processing time, with few steps, and no use of organic solvents. It results in lesser environmental and health concerns than the solvent casting method, which is the more widely used technique for film preparation [7,8].

In this scenario, the present study aimed to develop buccal films of BZN by using the thermopressing method, followed by a physicochemical characterization step. Polyvinyl alcohol (PVAL) was selected as the polymer matrix because it presents a melting temperature close to that of BZN and thus an appropriate press operating temperature could be selected to avoid drug degradation. PVAL also presents suitable mechanical, biocompatible and biodegradable properties [13]. Propylene glycol (PG) was used as a plasticizer, and thymol (TM) was selected because of its potential as a absorption chemical enhancer. An extensive physicochemical characterization of the formulated films was performed, including thermal, microscopy, X-ray diffraction, spectroscopic and mechanical assays as well as *ex vivo* permeability studies.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 MATERIALS

BZN (99% purity) was kindly supplied by LAFEPE (Recife, PE, Brazil). Thymol (98.5% purity) and PVAL (for film preparation) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brazil), respectively. Potassium acetate, calcium chloride and sodium chloride were purchased from HONEYWELL (Charlotte, NC, USA), VETEC and DINAMICA (Indaiatuba, SP, Brazil), respectively. Artificial saliva buffer (ASB) was prepared with 136.9 mM NaCl, 1.77 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄ and adjusted to pH 6.8 with 1 M HCl. Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB) was prepared with 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂.2H₂O, 1.0 mM MgCl₂.6H₂O, 5.5 mM glucose and adjusted to pH 7.4 with 1 M HCl. Methanol (MeOH) and acetonitrile were of HPLC grade and all other chemicals and reagents were of analytical grade. Water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Milford, MA, USA).

2.2 PREPARATION OF BUCCAL FILMS

The first attempt to prepare buccal films of BZN considered the solvent casting method. In this technique, a medium able to solubilize both drug and polymer needs to be selected, which is later removed. Acetone was selected as solubilization medium considering that BZN is slightly soluble in this solvent and presents very low aqueous solubility [14]. Surfactants such as

Pluronic® F-127, Pluronic® P-123 and lecithin were also individually tested to further improve drug solubility. When the solvent was removed by rotary evaporation, BZN recrystallized, suggesting that the surfactant could not encapsulate the BZN and the technique would not be suitable for film preparation. Recrystallization drug was also observed after inclusion in a cellulose acetate matrix. For this reason, the thermopressing method was alternatively selected. The preparation of thermopressed films was performed using a hydraulic press (Bovenau P15 ST, Rio do Sul, SC, Brazil) coupled with a heating system (Expectron Tecnologia Industrial Ltda, São José, SC, Brazil). The compounds were manually mixed in the mass proportions according to Table 1, resulting in a final composition of 3.0 g. Then, the mixtures were thermopressed between Kapton® polyimide sheets at 200 °C under 3 ton for 30 s, followed by gradual pressure during the next 30 s up to 12 tons. The films presented approximately 2.6 mg of BZN/cm². Immediately after film preparation, the thickness was determined in 5 different regions of each sample using a Mitutoyo® outside micrometer, model M310-25 (Sakado, Japan). The films were then stored in aluminum foil packaging inside a desiccator containing dried silica gel to prevent the absorption of water.

Table 1. Constitution of the different films.

Films	PVAL	BZN (5%)	PG (3%)	Thymol (3%)
PVAL	3.00 g			
PVAL-BZN	2.85 g	0.15 g		
PVAL-PG	2.91 g		0.09 g	
PVAL-BZN-PG	2.76 g	0.15 g	0.09 g	
PVAL-BZN-PG-TM	2.67 g	0.15 g	0.09 g	0.09

2.3 PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION

2.3.1 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC assays were performed using a DSC-50 equipment (Shimadzu, Kyoto, Japan). Samples of 6-10 mg of each film were sealed in aluminum pans with a pinhole in the lid, and the thermal properties were monitored at a heating rate of 5 °C min⁻¹ under a nitrogen atmosphere. The

samples were heated from room temperature to 110 °C, maintained at 110 °C for 15 min to evaporate the residual water, cooled to -60 °C and then reheated to 250 °C.

2.3.2 Thermogravimetric analysis (TGA)

Thermogravimetric analyses were performed in TGA-50 equipment (Shimadzu, Kyoto, Japan). Approximately 15 mg of each film sample were weighed and placed in platinum pans. The thermograms were recorded in the range of 25-600 °C, with a heating rate of 10 °C min⁻¹, under a nitrogen atmosphere.

2.3.3 ATR-FT-IR spectroscopy

Spectra of BZN, PG, thymol and of the buccal films were recorded on IR Prestige-21 equipment (Shimadzu, Kyoto, Japan). BZN samples were diluted by mixing 10 mg of the drug with 300 mg of KBr and the discs were prepared with a hydraulic press. The films were placed directly on the ATR sample holder. FT-IR spectra of each sample were recorded in a frequency range from 700 to 4,000 cm⁻¹, at room temperature, with the collection of 20 scans at a resolution of 2 cm⁻¹.

2.3.4 X-Ray Diffraction (XRD)

X-ray diffraction measurements were performed at room temperature on an Ultima IV diffractometer (Rigaku, Tokyo, Japan), using K α copper radiation ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$) and a D/teX Ultra detector. The X-ray generator was set to 40 kV and 30 mA. Samples were scanned in the range 3-40° 2 θ at a 5°/minute speed with a step width of 0.0100°. The films were cut and placed on the sample holder's aperture by the aid of an X-ray transparent tape (Kapton). The background arising from the sample holder was subtracted in the ultimate sample diffractograms. The crystallographic information files of BNZ [15] and PVAL [16] were obtained from the Cambridge Structural Database and the patterns were calculated in the Software Mercury 4.0.0 [17,18].

2.4 MECHANICAL ASSAYS

2.4.1 Tensile strength and percentile elongation at break

The tensile properties of prepared materials were measured using a universal tensile testing machine (EMIC – DL200, São José dos Pinhais, PR, Brazil) coupled with a 50 kN load cell. The thickness of five rectangular specimens (90 x 12.3 mm) was determined by the average in three different film regions and the films were stored for 48 h at room temperature (25 ± 2 °C) and $58 \pm 5\%$ of relative humidity before assays [19]. The gauge length and the crosshead speed were 50 mm and 12.5 mm min^{-1} , respectively. The values of Young's modulus, tensile strength and elongation at break were calculated from the stress-strain curves.

2.5 *IN VITRO* EVALUATION

2.5.1 Wettability

The contact angle values were obtained by using a Ramé-Hart model 250-F1 Goniometer (Succasunna, USA). For the measurements, droplets of distilled water (5 μL) were placed gently onto the film surface at room temperature and pressure. The dynamic contact angle was evaluated each second for 10 seconds, starting 3 seconds after the droplet application. Ten measures were performed for each film formulation.

2.5.2 Kinetics of water sorption

After preparation, the films were stored in a desiccator containing dried silica gel. Each sample of the films was cut into the dimension of 1 x 1 cm squares and dried at 40°C in an oven during 1h to eliminate residual moisture before the water sorption studies. The initial mass of the pre-dried films was then immediately measured, and the films were placed on different microclimates. The microclimates of 23 and 75% relative humidity (RH) were obtained by using saturated salt solutions of potassium acetate, and sodium chloride, respectively. A solution of 36% (w/w) calcium chloride was used to generate a 50% RH microclimate [20]. Acrylic containers with airtight lids, maintained at 23 ± 2 °C were used in the assays. Each RH was periodically verified using a thermohygrometer. The water mass incorporated in each film

was determined every 2 h during the first 12 h, then at 24, 30, 48 and 144 h. The water sorption rate (k) from the water uptake by the films was calculated by the linear slope of the weight gained (mg g^{-1}) *versus* time (h) plot.

2.5.3 Swelling behavior

Circular sections of films presenting 1.77 cm^2 were weighed (W_0) and placed in beakers containing 25 mL of artificial saliva buffer (pH 6.8) at 37°C . Considering the hydrophilic nature of the polymer, the films were taken from flasks after 10 min and the excess solvent was removed. The swelled films were then weighted (W_t). All assays were performed in triplicate. The swelling index (SI) of the films was calculated by using the following equation [21]:

$$SI(\%) = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} \times 100$$

2.6 EX VIVO EVALUATION

2.6.1 *Ex vivo* permeability studies

The porcine buccal mucosa has been extensively used as an *in vitro* model to study buccal permeability in view of the structural and enzymatic similarity to human mucosa as well as similar permeability characteristics [22]. On the other hand, this tissue is often damaged during the pig's mastication, and the separation of the buccal mucosa from the underlying tissue is time-consuming. Diaz-del Consuelo *et al.* (2005) found that the porcine esophageal mucosa can also be considered as a valid membrane model, presenting a larger area, being less prone to physical damage and is easier to separate from the muscular layer. Therefore, this animal tissue was selected for BZN transport studies. The porcine esophageal tissue was obtained from a local abattoir (Antonio Carlos, SC, Brazil) immediately after slaughter and was transported in cold KRB. The esophagus was cut longitudinally and rinsed with buffer. The mucosa was then separated from the muscular layer by cutting the connective fibers with a scissor. The esophageal tissue was maintained in cold KRB and used within 2 h after slaughter. Kulkarni *et al.* (2010) state that the porcine buccal tissue is able to maintain its permeability characteristics for up to 24 h when stored in KRB at 4°C . The permeability assays were performed in Franz-type

diffusion cells, which presented a diffusional area of 1.77 cm². The receptor chambers were filled with 50% of propylene glycol in the PBS buffer solution to maintain the sink conditions [25]. 2.0 mL of BZN solution (2.5 mg mL⁻¹ in propylene glycol) was used as control. The tested films were cut in 1.77 cm² pieces and weighted. The films were placed over the esophageal mucosa, and 150 µL of simulated saliva solution were added over each film. The system was kept at 37 °C under constant magnetic stirring at 765 rpm. Aliquots of 400 µL were taken from the receptor compartment every 1 h for 10 h with the replacement of fresh solution. Samples were diluted with an equal volume of acetonitrile to precipitate proteins, vortexed, centrifuged at 2,000 x g for 5 min and BZN from the supernatant was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) (item 2.8). At the end of the permeability study, the control solution and the films were removed and the mucosa samples were placed in separated pre-weighed tubes, 3 mL of acetonitrile was added, and these flasks were kept overnight at 4 °C. After 12 h, the samples were sonicated for 15 min, centrifuged at 2,000 x g for 5 min and BZN extracted from the mucosa was analyzed by HPLC. The results were normalized by the BZN amount proportional to the weight of each film piece.

2.6.1.1 Calculations of the permeability data

The cumulative amount of drug permeated (Q_t) was calculated by the following equation [26]:

$$Q_t = V_r C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_s C_i$$

where V_r and V_s represent the volumes of the receptor solution and sample, respectively; C_t is the drug concentration on the receptor medium at each sampling time and C_i is the accumulated drug concentration at the i th time. Data were expressed as the cumulative amount of drug per area unit Q_t/S ($S = 1.77$ cm²).

The steady-state flux (J_s) was calculated from the linear slope of the cumulative amount of BZN permeated *versus* time. The permeability coefficient (P) was determined by the relation between J_s and the initial donor concentration ($P = J_s/C_d$). Lag time was expressed as the time required to achieve the steady-state flux, which is represented by the intercept of the regression line with the abscissa.

2.7 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

SEM analysis were performed to evaluate the films' surface morphology before and after the permeation studies. A piece of film was fixed on stubs with double adhesive carbon tape and coated with gold palladium using a gold sputter module in a high vacuum evaporator. Samples were then observed with JSM-6390LV Scanning Electron Microscope (JEOL, Tokyo, Japan) using secondary electron imaging at 10 kV.

2.8 HPLC ANALYSIS

The HPLC method was optimized to obtain a short analysis time, good resolution and adequate sensitivity based on previous studies [27,28]. Concentrations between 0.1-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of both samples and standard solutions were assessed by using a Perkin-Elmer Series 200 HPLC (Waltham, MA, USA), equipped with a UV detector, pump, autoinjector and online degasser. The chromatographic separation of BZN was performed on a C18 column (Zorbax[®] ODS, 150 x 4.6 mm, 5 μm particle size; Agilent, Santa Clara, CA, USA) preceded by a guard column of the same packing material (KJ0-4282, Phenomenex[®], Torrance, CA, USA) at room temperature. The mobile phase was composed of 20 mM ammonium acetate (pH 6.5) and MeOH in a ratio of 55:45 v/v. Elution was performed isocratically at a flow rate of 1 mL min^{-1} with a sample injection volume of 20 μL and a total sample acquisition time of 7 min. The wavelength of the detector was set to 324 nm. The method was validated according to guidelines on analytical method validation [29], and it showed to be linear ($r > 0.999$), precise (intraday relative standard deviation $< 2.25\%$), accurate (recovery values ranged from 99-100%) and specific. The detection and quantification limits were 0.03 and 0.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

2.9 STATISTICAL ANALYSIS

Results were analyzed by using GraphPad Prism software (version 6.01). One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for grouped analysis.

3 RESULTS

3.1 PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION

3.1.1 Thickness of films and macroscopic visual analysis

The formulations presented similar thickness values (Table 2). PVAL-BZN-PG films, in turn, showed a lower thickness ($p < 0.05$). The low standard deviation suggests that the tested film formulations are uniform. These systems had similar visual macroscopic features, with the PVAL-BZN-PG-TM films presenting a darker yellowish color.

Table 2. Properties of PVAL film formulations: thickness, contact-angle, swelling index and water sorption rate at 50% and 75% RH.

Sample	Thickness (mm)	Contact angle analysis (°)	SI (%)	k (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	
				50% RH	75% RH
PVAL	0.41 ± 0.01 (a)	93.7 ± 10.0 (a)	143.7 ± 16.8 (abc)	3.27 ± 0.18 (a)	2.41 ± 0.03 (a)
PVAL-BZN	0.43 ± 0.01 (a)	86.8 ± 6.17 (a)	159.5 ± 29.6 (b)	2.57 ± 0.19 (a)	2.15 ± 0.09 (a)
PVAL-BZN-PG	0.37 ± 0.02 (b)	95.0 ± 7.69 (a)	100.9 ± 6.52 (c)	4.79 ± 1.50 (a)	4.87 ± 0.51 (b)
PVAL-BZN-PG-TM	0.41 ± 0.03 (a)	98.3 ± 10.5 (a)	150.3 ± 23.0 (abc)	4.02 ± 1.02 (a)	3.57 ± 0.56 (ab)

Data expressed as mean ± SD. One-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$) was used to compare different formulations for each tested parameter. Different letters indicate significant difference among formulations. SI = Swelling Index.

3.1.2 X-Ray Diffraction

The X-ray powder diffraction patterns of the thermopressed film formulations containing BZN are shown in Fig 1. The films appear to be stable as no significant recrystallization, phase or crystallinity changes have been observed with aging. The diffraction patterns of the films demonstrated low crystallinity and the main crystallographic feature observed is a weak reflection at approximately $20^\circ 2\theta$. This diffraction peak corresponds to the PVAL structure [16,30], which is the main film constituent. No diffraction characteristic peaks of BNZ were evidenced, suggesting that the drug is distributed in the solid films without crystalline periodicity [15]. For comparison, the diffraction pattern of crystalline PVAL and

BNZ were calculated and are shown in Fig. 2. The PVAL structure has been solved elsewhere in the monoclinic space group $P2_1/m$ ($a=7.81 \text{ \AA}$, $b=2.82 \text{ \AA}$, $c=5.51 \text{ \AA}$, $\beta=91.60^\circ$) [16]

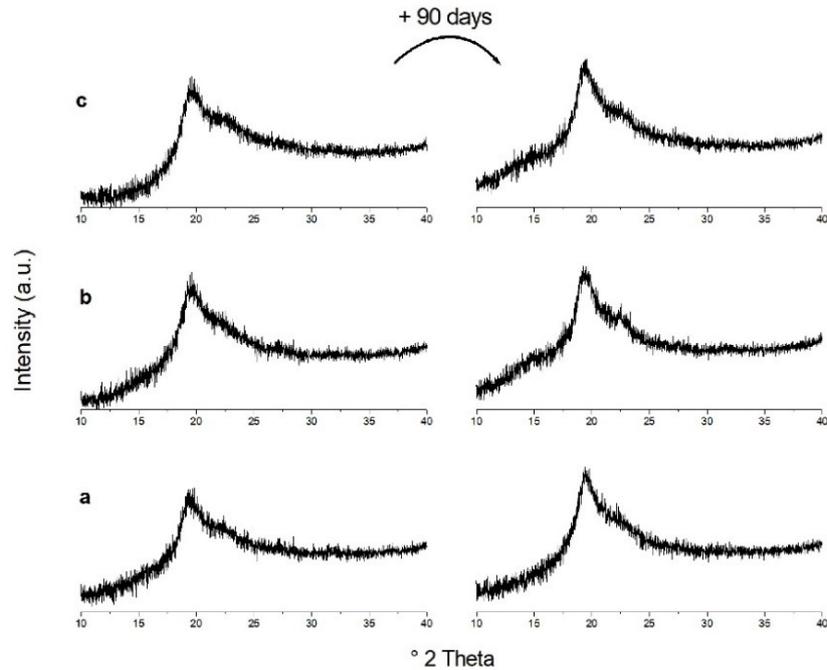


Fig. 1 X-ray powder diffraction patterns of freshly prepared films (left) and after 90 days (right). “a”, “b” and “c” represent PVAL-BZN, PVAL-BZN-PG and PVAL-BZN-PG-TM films, respectively.

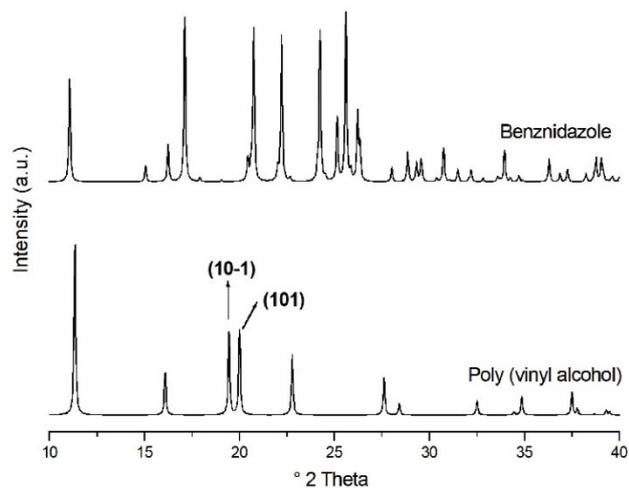


Fig. 2 Calculated X-ray powder diffraction pattern of crystalline PVAL (BUNN, 1948) and BNZ (SOARES-SOBRINHO *et al.* 2008). The reflections related to the (10-1) and the (101) planes of the PVAL structure are indicated.

3.1.3 DSC analysis

The DSC analyses (Table 3; Fig. 3) were performed to observe possible interactions between BZN, PVAL and other constituents from the buccal film. BZN thermogram showed a sharp endothermic peak at 193.2 °C (117.73 J g⁻¹), which corresponds to its melting temperature [31]. This event is relatively close to the PVAL melting point, represented by the mean transition temperature (T_m) at 192.4 °C, making it difficult to distinguish if BZN maintained its crystalline form or may be found in an amorphous form on the film blends by considering this analysis. The PVAL films presented a glass transition temperature (T_g) at 65.1 °C. The PVAL-BZN and PVAL-PG films, in turn, presented a slight shift of the T_g and a more pronounced reduction of this parameter, respectively. Both films resulted in minor changes on T_m value of PVAL. On the other hand, the combination of BZN and PG in the PVAL-BZN-PG and PVAL-BZN-PG-TM film blends shifted the T_g and T_m to even lower temperatures than the films with only one of these constituents. The presence of thymol in the PVAL-BZN-PG-TM film seemed to change the T_g and T_m to lower temperatures than the other films. An exothermic event was observed above 210 °C, which was related to the decomposition of BZN [14].

Table 3. Thermal characteristics of the film blends and BZN obtained from DSC analysis.

Sample	Temperature (°C)						Range ($T_e - T_o$)	ΔH (J g ⁻¹)
	T_g onset	T_g	T_g endset	T_o	T_m	T_e		
BZN	-	-	-	186.3	193.2	201.4	12.7	117.73
PVAL	59.9	65.1	70.3	168.2	192.4	206.6	38.3	35.9
PVAL-BZN	56.1	62.0	67.9	165.2	192.8	207.2	42.0	39.6
PVAL-PG	49.0	55.8	62.5	164.5	191.7	206.5	42.0	33.1
PVAL-BZN-PG	42.9	51.5	60.1	154.4	190.2	206.0	51.6	42.8
PVAL-BZN-PG-TM	43.9	51.2	58.4	163.1	189.7	206.0	43.0	38.6

T_g – Glass transition; T_o – Onset temperature; T_m – Mid-point temperature; T_e – Endset temperature

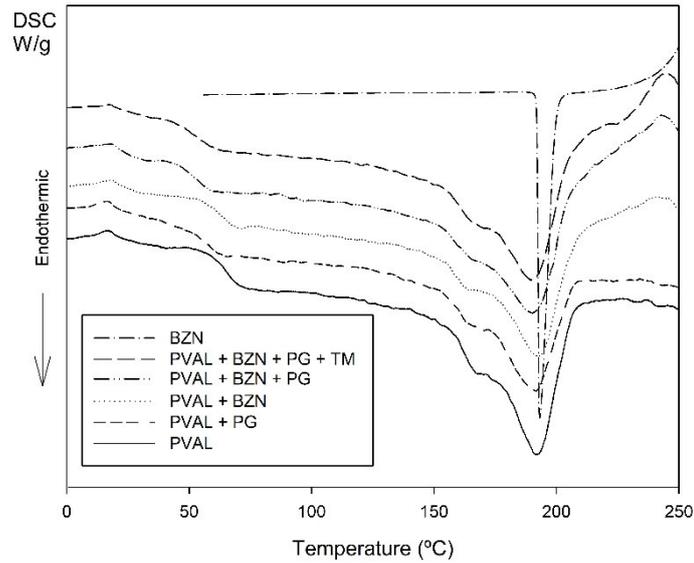


Fig. 3 DSC thermograms of the different films and BZN. (—) PVAL film; (···) PVAL-BZN; (- - -) PVAL-PG film; (-·-) PVAL-BZN-PG film; (- - ·) PVAL-BZN-PG-TM and (-) BZN powder.

3.1.4 TG analysis

The effect of BZN and the film constituents on the thermal stability of PVAL films was also investigated by TG analyses. The TG curve (Fig. 4) of BZN presents a weight loss event of 45.0% with a maximum rate at 293.4 °C relative to its partial decomposition. The thermal decomposition of PVAL films presented three main stages: an initial weight loss of 6.0% at 142.8 °C, probably related to the removal of residual absorbed water (since PVAL is hydrophilic) and the degradation of the polymer chains to smaller fragments through primary decomposition; a second degradation at 365.9 °C with 55.3 % of weight loss, due to decomposition of PVAL's acetate and side chains; and the third degradation at 458.56 °C with 30.35% of weight loss, due to oxidation/combustion of the polymer main chain [32]. The PVAL-PG film displayed a similar profile to the PVAL film. The presence of BZN in the film blends PVAL-BZN, PVAL-BZN-PG and PVAL-BZN-PG-TM seemed to decrease the thermal stability of PVAL, particularly for the film without PG. PVAL-BZN-PG-TM films showed to be more thermally unstable.

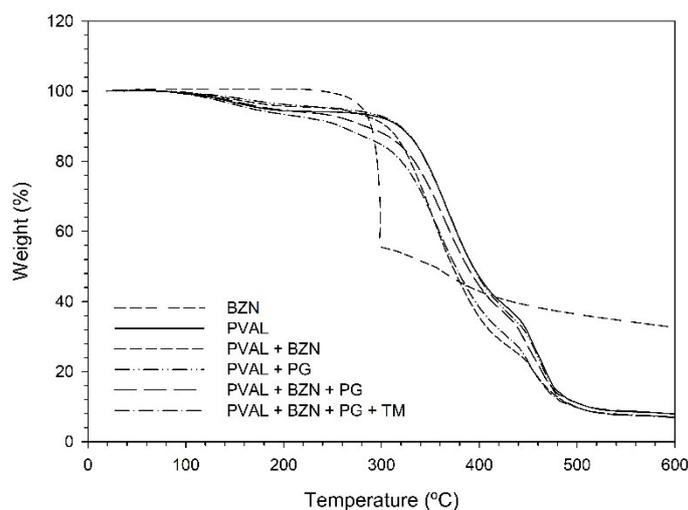


Fig. 4 Thermogravimetric analysis the different films and BZN. (—) PVAL film; (---) PVAL-BZN; (-·-) PVAL-PG film; (- - -) PVAL-BZN-PG film; (-·) PVAL-BZN-PG-TM and (-·-·) BZN powder.

3.1.5 ATR FT-IR spectroscopy

The chemical interactions between BZN, PVAL and other film constituents were also assessed by comparing the FT-IR spectra of the raw material and the film blends (Fig. 5). The IR spectrum of the PVAL film showed the following characteristic bands: a large band between $3550\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, which is associated with the O-H stretching from intramolecular and intermolecular hydrogen bonds; two bands at ~ 2840 and $\sim 2910\text{ cm}^{-1}$ that refer to C-H stretching from alkyl groups; bands at $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$, which correspond to C=O stretching from acetate groups [33]. Considering that the polymer is the major constituent of the films, and the other constituents are present in low concentrations, more reliable information on polymer chemical interactions may be obtained. Interestingly, small BZN characteristic bands at 1661 cm^{-1} (carbonyl stretching) and 3276 cm^{-1} (N-H stretching vibrations) are observed only in the spectrum of the PVAL-BZN-PG-TM film.

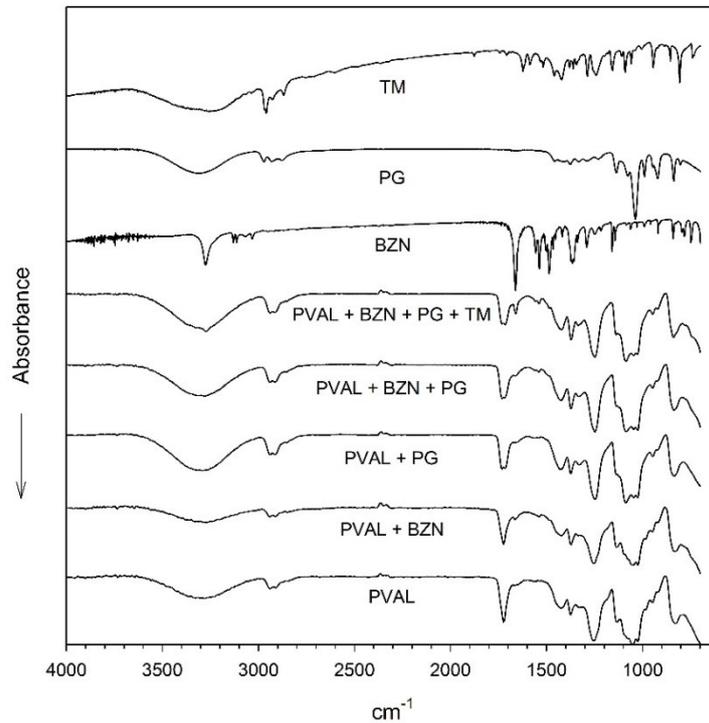


Fig. 5 FT-IR analysis of the isolated constituents of the films and the different film blends.

3.2 MECHANICAL PROPERTIES

PVAL films were rigid and brittle, showing Young's modulus and tensile strength around 1740 and 45 MPa, respectively, and elongates only 10% before breaking point (Fig. 6; Table 4). PVAL-BZN films, in turn, presented only a slight reduction in these parameters in comparison to the PVAL films; however, they were able to elongate 95% before breaking point. The addition of PG as a plasticizer significantly changed the mechanical properties of the material. PVAL-PG-BZN and PVAL-PG-BZN-TM films virtually lost the elastic characteristics of the PVAL, becoming an elastomer-like material [34,35]. In this way, Young's modulus determination of these films was difficult to obtain once the samples did not present a well-defined elastic region. The modulus of elasticity values highly decreased (approximately 97%) and the elongation at break increased to almost 380%, particularly in PVAL-BZN-PG-TM films.

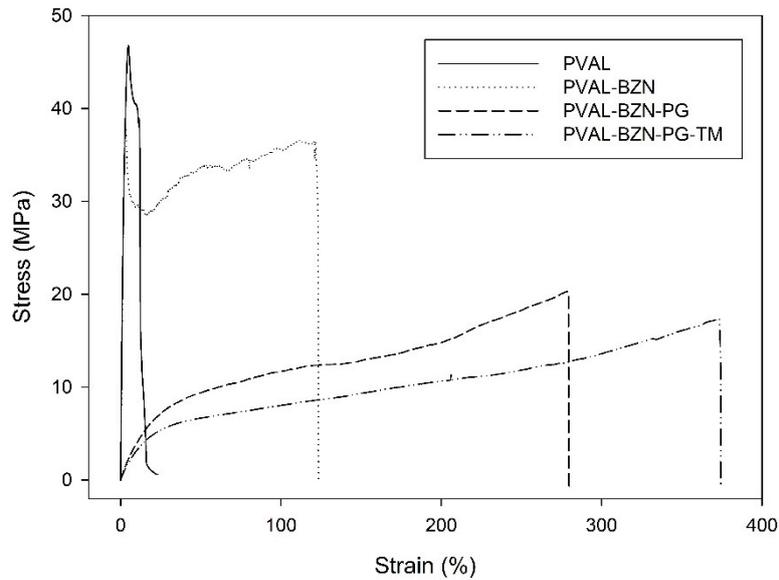


Fig. 6 Stress-strain curve for different PVAL-based films: (—) PVAL; (···) PVAL-BZN; (---) PVAL-BZN-PG and (-·-) PVAL-BZN-PG-TM

Table 4 Tensile data of different compositions of PVAL-based films.

Sample (n = 5)	Young's modulus (MPa)	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
PVAL	1737.8 ± 190.3 ^(a)	45.4 ± 4.8 ^(a)	10.0 ± 6.4 ^(a)
PVAL-BZN	1571.2 ± 146.8 ^(a)	37.7 ± 3.3 ^(b)	95.2 ± 17.2 ^(b)
PVAL-BZN-PG	52.9 ± 12.8 ^(b)	20.1 ± 1.6 ^(c)	288.2 ± 23.9 ^(c)
PVAL-BZN-PG-TM	37.4 ± 5.9 ^(b)	17.9 ± 0.54 ^(c)	379.8 ± 22.1 ^(d)

Data expressed as mean ± SD. One-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$) was used to compare different formulations for each tested parameter. Different letters indicate significant difference among formulations.

3.3 *IN VITRO* EVALUATION

3.3.1 Wettability analysis

The water contact angle measurements were performed to investigate the surface wettability of the films (Table 2). Lower contact angle values indicate a tendency of the water to spread and adhere to the surface, while higher values indicate the surface's tendency to repel the water [36]. Although no statistical difference has been observed between the different samples ($p > 0.05$, ANOVA/Tukey's test), the PVAL-BZN and PVAL-BZN-PG-TM films showed to have a

higher and slightly lower wetting tendency, respectively. Thymol presents a log P value of 3.28, which would contribute to increasing the film hydrophobicity.

3.3.2 Kinetics of water sorption

At 23 % RH, the water uptake was <1% of the initial film mass for all the samples and thus water sorption rate was not calculated. At 50 and 75% RH, the films adsorbed water at a linear rate during the first 24 h, and after this period, the weight of the films seemed to have stabilized. At 50 % RH, PVAL-BZN-PG and PVAL-BZN-PG-TM tend to adsorb more moisture whereas PVAL-BZN films seem to adsorb less moisture; however, no statistical differences among the water sorption rates were found (Table 2). At 75% RH, PVAL-BZN-PG films presented a higher water sorption rate whereas the other samples preserved the same behavior observed at 50% RH. Overall, the films containing PG seemed to adsorb a higher amount of moisture, which corroborates with the hygroscopic nature of this plasticizer.

3.3.3 Swelling behavior

Given that PVAL films are characterized by a rapid disintegration, the swelling behavior of film formulations was evaluated 10 min after hydration. Only PVAL-BZN and PVAL-BZN-PG films were statistically different ($p < 0.05$) (Table 2). While the PVAL-BZN films absorbed the highest amount of water (159.5% of the initial weight), a reduced amount of water (100.9% of the initial weight) was absorbed by PVAL-BZN-PG films.

3.4 EX VIVO PERMEABILITY STUDIES

The permeability assays were performed to compare the absorption of the BZN from the PVAL-based films and control solution through the esophageal mucosa (Fig. 7). The permeability flux of BZN (control) was $0.54 \pm 0.15 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ (Table 5), presenting a permeability coefficient of $2.17 \times 10^{-4} \pm 0.58 \times 10^{-4} \text{ cm h}^{-1}$, and a lag time of $4.49 \pm 0.80 \text{ h}$. PVAL-BZN and PVAL-BZN-PG films displayed similar permeability parameters as the control solution ($p > 0.05$). The addition of thymol as a permeability enhancer (PVAL-BZN-PG-TM film) improved the buccal absorption of BZN 5.9x and 3.0x when compared to the control solution and PVAL-BZN,

respectively. No interference on lag time was observed after the inclusion of this absorption enhancer.

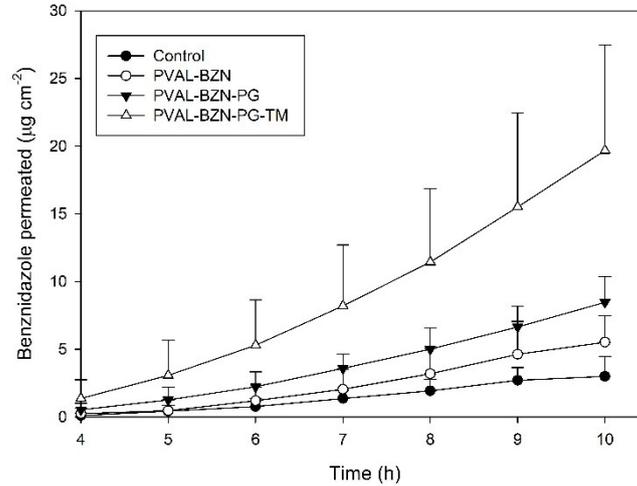


Fig. 7 Permeability profile of BZN on esophageal mucosa from control solution (2.5 mg mL⁻¹) (●) and the different film formulations: PVAL-BZN (○); PVAL-BZN-PG (▼) and PVAL-BZN-PG-TM (△). (n=6)

Table 5 Buccal permeability parameters of benznidazole (control) and of PVAL-BZN films.

Sample	J _s (µg cm ⁻² h ⁻¹)	T _L (h)	P (cm h ⁻¹)	BZN
				permeated (%)
Control	0.54 ± 0.15 (a)	4.49 ± 0.80 (a)	2.17 x 10 ⁻⁴ ± 5.82 x 10 ⁻⁵ (a)	0.11 ± 0.05 (a)
PVAL-BZN	1.07 ± 0.22 (a)	4.97 ± 1.07 (a)	4.28 x 10 ⁻⁴ ± 8.76 x 10 ⁻⁵ (a)	0.20 ± 0.07 (a)
PVAL-BZN-PG	1.38 ± 0.17 (a)	4.21 ± 0.77 (a)	5.52 x 10 ⁻⁴ ± 6.71 x 10 ⁻⁵ (a)	0.30 ± 0.07 (a)
PVAL-BZN-PG-TM	3.19 ± 1.01 (b)	4.23 ± 0.86 (a)	12.8 x 10 ⁻⁴ ± 4.04 x 10 ⁻⁴ (b)	0.72 ± 0.26 (b)

Data expressed as mean ± SD. One-way ANOVA followed by Tukey's test (p<0.05) was considered for each permeability parameter separately. Different letters indicate significant difference among treatments. J_s = flux; T_L = lag time; P = permeability coefficient.

3.5 SEM

The physical appearance of the buccal films before permeation is smooth, non-porous and uniform (Fig. 8). Drug and thymol particles are embedded in the polymeric matrix and are homogeneously dispersed in the films. After the permeability studies, the side of the films in contact with the mucosal surface presented erosion of the polymeric matrix, demonstrating the

presence of BZN crystals. Interestingly, BZN crystals were not observed on PVAL-BZN-PG-TM eroded films, on either side of the sample (mucosal or air facing sides). Also, the side of the PVAL-BZN and PVAL-BZN-PG films in contact with the air does not present any BZN crystals, and are smoother than the side facing the mucosa.

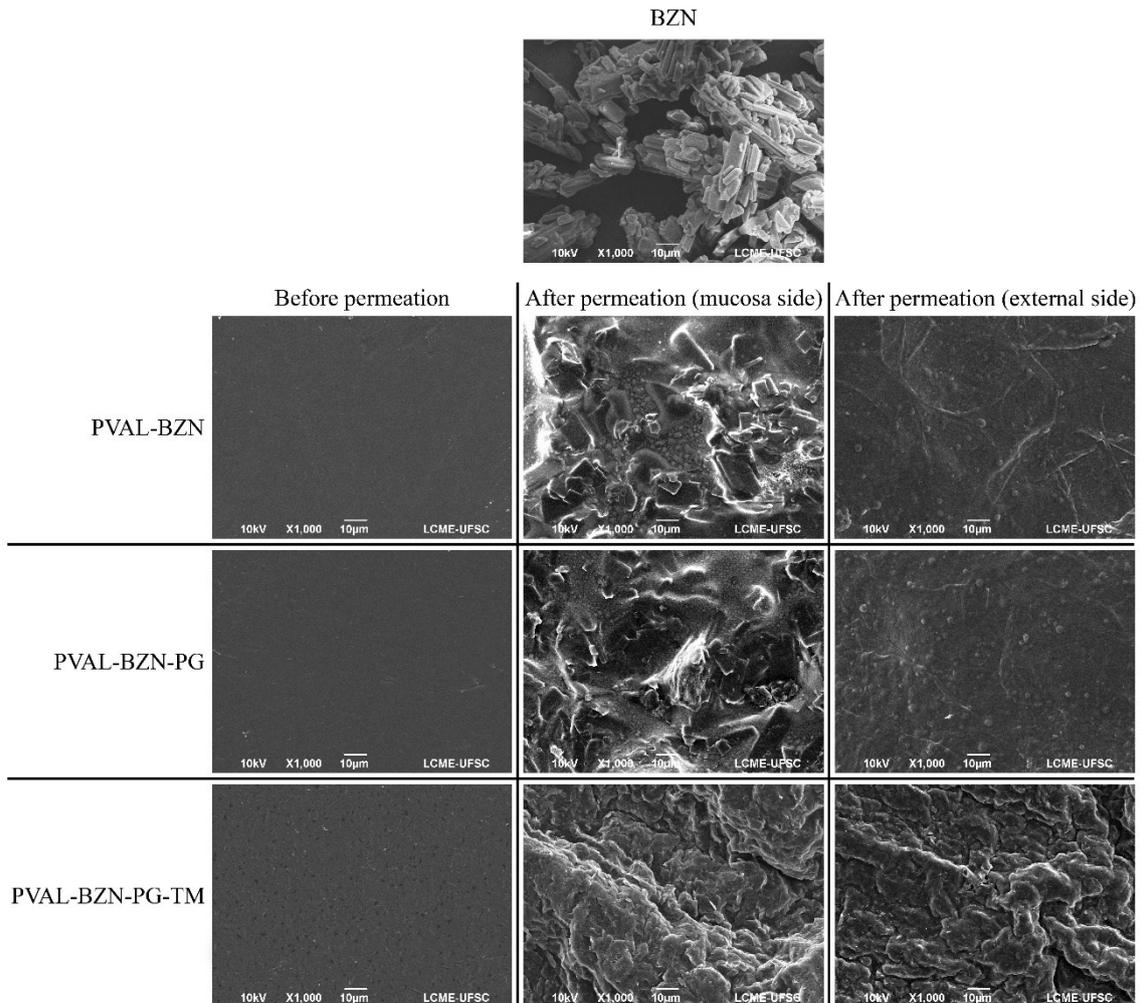


Fig. 8 SEM images of BZN powder and film formulations before and after the permeability studies.

4 DISCUSSION

As already mentioned, this study aimed to develop a formulation suitable for the buccal administration of BZN. Among the techniques used to prepare buccal mucoadhesive films, the solvent casting technique is the most widely used in the literature. A recurrent concern of this method, however, is the use of organic solvents, which may leave undesired residuals in formulations [12]. Additionally, the solubility, dissolution and uniformity of content may be

affected by the crystallization of the active pharmaceutical ingredient when this method is used [8]. Indeed, BZN presents low aqueous solubility and is only slightly soluble in organic solvents such as acetone [14]. This characteristic favored the formation of crystals during the drying step of the film preparation (results not shown). In contrast, the thermopressing method does not use solvents and presents a shorter processing time. In our experiments, the press temperature was strictly controlled to allow the melting of the film constituent (polymer) but also preventing the degradation of the BZN since TGA results demonstrated that BZN degradation onset is at $\sim 250^{\circ}\text{C}$. The thermopressing method resulted in homogenous, uniform and non-porous films. BZN was maintained in its amorphous form, even after 90 days of storage, as observed in the XRD analyses. Experimental PXRD patterns reported in the literature have already demonstrated that the two strongest reflections in semi-crystalline PVAL samples are the 10-1 and 101 reflections at 19.4° and 20° 2θ , respectively [30]. This result indicates the anisotropy of the PVAL crystallites in film samples. This lattice orientation and the low crystallinity, however, were not disrupted by changing the film constitution (*i.e.* addition of PG and thymol). The addition of BZN, PG and TM on the PVAL films reduced the T_g of PVAL, particularly when these components were combined (as in PVAL-BZN-PG-TM films), demonstrating that they have a synergic plasticizer property. PVAL-BZN films presented only a slight decrease in Young's modulus and tensile strength when compared to the pure PVAL film due to the presence of the small BZN molecule, which probably reduces polymer-polymer interactions. Cho *et al.* (2009) have reported that PG plays a role as a hydrogen bond breaker in PVAL films, affecting its thermal and mechanical properties. Indeed, the addition of PG as a plasticizer (PVAL-BZN-PG and PVAL-BZN-PG-TM) changed drastically the elastic properties of the PVAL films, increasing up to 380% the elongation at break in the films also containing thymol. This behavior occurs because the PG plasticizer increases the spacing between polymer chains and significantly decreases polymer-polymer interaction, improving the shear behavior between these chains [34]. Similar conclusions were obtained by Tian *et al.* (2017) in another study involving the plasticization of PVAL films with sorbitol. These results demonstrate that it is possible to prepare PVAL films containing BZN, PG and thymol with the intended mechanical characteristics, such as flexibility, softness and tear-resistance, which could improve patient acceptability.

The moisture absorption by the films can affect the stability as it may interact with the active pharmaceutical ingredient, contribute to the growth of microorganisms and change the film mechanical properties considering the role of the water as a plasticizer [38]. The PVAL-BZN

films seem to be prone to moisture uptake, considering they presented a higher wettability and swelling index. The addition of BZN to the films probably reduces the interaction of polymer chains by disrupting the PVAL hydrogen bonds, leaving more free space for hydration. Other studies have already reported an increased swelling index of hydrophilic polymer-based films by the addition of hydrophobic drugs [39,40]. Once the BZN would increase the polymer chain free spaces, greater film thickness is observed in this situation. PVAL-BZN-PG films, in turn, presented a lower swelling index, which could be attributed to the interaction of PG with PVAL via hydrogen bonding, reducing the effective water uptake by the polymer [41]. On the other hand, the PVAL-BZN-PG films seemed to have a higher water sorption rate through 24 h at 50 and 75 % RH, which may be due to the hygroscopic nature of the plasticizer.

Thymol was added in PVAL films to play a role as an absorption chemical enhancer once its isomer carvacrol has already demonstrated to improve the buccal permeability of BZN in a previous study performed by our research team [25]. It also presents trypanocidal action, both *in vitro*, against epimastigote forms of the parasite [42], and in mice, reducing significantly the counting of amastigote nests after 28 days of infection [43]. In addition, thymol seems to be able to provide other important film characteristics, reduce the thermal stability of PVAL films and increase flexibility. Similarly, Villegas *et al.* (2019) have previously reported the effect of thymol as a plasticizer on poly(lactic acid)-based bio-nano composite films.

Modifications in the mechanical properties may likely affect the mechanism of drug release from polymeric formulations. In fact, the films containing thymol showed considerable erosion of the polymeric network on both film surfaces in the permeability studies. The thymol-free formulations, however, seem to present a drug release mechanism dominated by the chemical potential gradient and the drug diffusion from film towards the biological tissue. These characteristics may justify the greater absorption of BZN through the buccal mucosa observed in the thymol-containing films. The balance between diffusion and erosion is known to affect the rate of drug delivery from polymer matrices enriched with excipients [45]. In the study, the change in the dominant mechanism of drug release to erosion have also avoided the crystallization of BZN within the film, contributing to its promotion effect on permeation. In contrast, BZN crystallizes along the assays in the thymol-free films, which follow a release mechanism dominated by diffusion. The absorption of water within the film could generate an environment able to reduce the BZN solubility, resulting in crystallization. It is unclear if the thymol presents a direct effect as a crystallization inhibitor in combination to the promotion of erosion. In any case, however, the results here presented highlight that physicochemical

characteristics, other than the interactions between formulation constituents with mucosa, are also relevant and should be considered in the delivery of drugs through biological barriers.

As a future perspective, these film formulations can be further improved by adding layers with polymers that present stronger mucoadhesion properties, such as chitosan using spin-coating, for example. The addition of an impermeable layer to the external part of the films is an alternative for future studies targeting an unidirectional releasing film [11] and, perhaps, decreasing the crystallization of BZN in diffusion-dominated formulations.

5 CONCLUSIONS

The thermopressing method showed to be suitable to prepare PVAL films containing BZN, providing homogenous, smooth and non-porous films. BZN remained stable and amorphous in polymer films over 90 days. PVAL films prepared with PG and thymol showed more suitable mechanical properties (soft, flexible and tear-resistant), characteristics that improve the patient acceptability. Moreover, the addition of thymol as a chemical absorption enhancer increased film erosion and inhibited the formation of BZN crystals in the film. It also presented a role as film plasticizer and may act synergistically with the BZN by considering its already reported trypanocidal action. The addition of a stronger mucoadhesive layer, or even an impermeable layer to target the release of BZN to the buccal mucosa, should be considered in future studies.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Brazilian governmental agencies CNPq/MCTI (Universal 01/2016 - Grant number: 408229/2016-0) and CAPES/MEC for financial support for this project and for student scholarships. The authors would also like to thank the LCME-UFSC and the researcher Andressa Cristiana Fröhlich for technical support during SEM analyses, LAFEPE/PE for the donation of the BZN, and Prof. Silvia L. Cuffini from UNIFESP-São José dos Campos for the technical support during the XRD analyses.

REFERENCES

- [1] OMS, Chagas disease (American trypanosomiasis) Epidemiology, OMS. (2018). <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/> (accessed January 30, 2020).
- [2] J.R. Coura, P.A. Viñas, Chagas disease: a new worldwide challenge, *Nature*. 465 (2010) S6–S7. <https://doi.org/10.1038/nature09221>.
- [3] V.G. Perdomo, J.P. Rigalli, M.G. Luquita, J.M. Pellegrino, M.L. Ruiz, V.A. Catania, V.G. Perdomo, J.P. Rigalli, M.G. Luquita, J.M. Pellegrino, M.L. Ruiz, V.A. Catania, Up-regulation of ATP-binding cassette transporters in the THP-1 human macrophage cell line by the antichagasic benznidazole, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 111 (2016) 707–711. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160080>.
- [4] L. Perin, R. Moreira da Silva, K. da S. Fonseca, J.M. de O. Cardoso, F.A.S. Mathias, L.E.S. Reis, I. Molina, R. Correa-Oliveira, P.M. de A. Vieira, C.M. Carneiro, Pharmacokinetics and tissue distribution of benznidazole after oral administration in mice, *Antimicrob. Agents Chemother*. 61 (2017). <https://doi.org/10.1128/AAC.02410-16>.
- [5] I. Molina, F. Salvador, A. Sánchez-Montalvá, B. Treviño, N. Serre, A. Sao Avilés, B. Almirante, Toxic profile of benznidazole in patients with chronic Chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers, *Antimicrob. Agents Chemother*. 59 (2015) 6125–6131. <https://doi.org/10.1128/AAC.04660-14>.
- [6] F.M. Santos, S. Caldas, S.B. de Assis Cáu, G.P. Crepalde, M. de Lana, G.L.L. Machado-Coelho, V.M. Veloso, M.T. Bahia, *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance *in vivo* and its modulation by *in vitro* culturing and mice infection, *Exp. Parasitol*. 120 (2008) 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.09.007>.
- [7] M. Montenegro-Nicolini, J.O. Morales, Overview and future potential of buccal mucoadhesive films as drug delivery systems for biologics, *AAPS PharmSciTech*. 18 (2017) 3–14. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0525-z>.
- [8] Y. Tian, M. Orlu, H.J. Woerdenbag, M. Scarpa, O. Kiefer, D. Kottke, E. Sjöholm, H. Öblom, N. Sandler, W.L.J. Hinrichs, H.W. Frijlink, J. Breitkreutz, J.C. Visser, Oromucosal films: from patient centricity to production by printing techniques, *Expert Opin. Drug Deliv*. 16 (2019) 981–993. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1652595>.

- [9] G.K. Eleftheriadis, C. Ritzoulis, N. Bouropoulos, D. Tzetzis, D.A. Andreadis, J. Boetker, J. Rantanen, D.G. Fatouros, Unidirectional drug release from 3D printed mucoadhesive buccal films using FDM technology: *In vitro* and *ex vivo* evaluation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 144 (2019) 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.018>.
- [10] J.A. Nicolazzo, B.L. Reed, B.C. Finnin, Buccal penetration enhancers—How do they really work?, *J. Control. Release.* 105 (2005) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.01.024>.
- [11] S. Barua, H. Kim, K. Jo, C.W. Seo, T.J. Park, K. Bin Lee, G. Yun, K. Oh, J. Lee, Drug delivery techniques for buccal route: formulation strategies and recent advances in dosage form design, *J. Pharm. Investig.* 46 (2016) 593–613. <https://doi.org/10.1007/s40005-016-0281-9>.
- [12] J.O. Morales, J.T. McConville, Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77 (2011) 187–199. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2010.11.023>.
- [13] A. Abruzzo, F.P. Nicoletta, F. Dalena, T. Cerchiara, B. Luppi, F. Bigucci, Bilayered buccal films as child-appropriate dosage form for systemic administration of propranolol, *Int. J. Pharm.* 531 (2017) 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.070>.
- [14] F.P. Maximiano, G.H.Y. Costa, J. De Souza, M.S.S. Da Cunha-Filho, Physicochemical characterization of antichagasic benzimidazole, *Quim. Nova.* 33 (2010) 1714–1719. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000800018>.
- [15] J.L. Soares-Sobrinho, M.S.S. Cunha-Filho, P.J.R. Neto, J.J. Torres-Labandeira, B. Dacunha-Marinho, Benzimidazole, *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* E64 (2008) 1–8. <https://doi.org/10.1107/S1600536808005023>.
- [16] C.W. Bunn, Crystal structure of polyvinyl alcohol, *Nature.* 161 (1948) 929–930.
- [17] C.F. Macrae, I.J. Bruno, J. a. Chisholm, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P. a. Wood, Mercury CSD 2.0 – new features for the visualization and investigation of crystal structures, *J. Appl. Crystallogr.* 41 (2008) 466–470. <https://doi.org/10.1107/S0021889807067908>.
- [18] I.J. Bruno, J.C. Cole, P.R. Edgington, M. Kessler, C.F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, New software for searching the Cambridge Structural Database and visualizing crystal

structures, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* 58 (2002) 389–397. <https://doi.org/10.1107/S0108768102003324>.

[19] ASTM International, ASTM D882: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, *ASTM Stand.* (2012) 12. <https://doi.org/10.1520/D0882-12.2>.

[20] DOW, Calcium Chloride Handbook - A guide to properties, forms, storage and handling, 2003. <https://fliphtml5.com/uncx/efyb> (accessed February 21, 2020).

[21] N.A. Nafee, F.A. Ismail, N.A. Boraie, L.M. Mortada, Mucoadhesive Delivery Systems. I. Evaluation of mucoadhesive polymers for buccal tablet formulation, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30 (2004) 985–993. <https://doi.org/10.1081/DDC-200037245>.

[22] U. Kulkarni, R. Mahalingam, S.I. Pather, X. Li, B. Jasti, Porcine buccal mucosa as an *in vitro* model: Relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 471–483. <https://doi.org/10.1002/jps.21436>.

[23] I. Diaz-del Consuelo, Y. Jacques, G.-P. Pizzolato, R.H. Guy, F. Falson, Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers, *Arch. Oral Biol.* 50 (2005) 981–987. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2005.04.008>.

[24] U. Kulkarni, R. Mahalingam, I. Pather, X. Li, B. Jasti, Porcine buccal mucosa as *in vitro* model: Effect of biological and experimental variables, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 1265–1277. <https://doi.org/10.1002/jps.21907>.

[25] B.R. Amaral, D.F. Argenta, R. Kroth, T. Caon, Transbuccal delivery of benznidazole associated with monoterpenes: permeation studies and mechanistic insights, *Eur. J. Pharm. Sci.* 143 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105177>.

[26] A.C. Sintov, S. Botner, Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems, *Int. J. Pharm.* 311 (2006) 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.12.019>.

[27] M.J. Morilla, M.J. Prieto, E.L. Romero, Benznidazole vs benznidazole in multilamellar liposomes: how different they interact with blood components?, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100 (2005) 213–219. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000200017>.

[28] R.M. Da Silva, L.T. Oliveira, N. Márcia, S. Barcellos, J. De Souza, M. De Lana, Preclinical

monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2012). <https://doi.org/10.1128/AAC.05785-11>.

[29] ICH, Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2 (R1), ICH Harmon. Tripart. Guidel. (2005).

[30] R. Ricciardi, F. Auriemma, C. De Rosa, F. Ii, C.M.S. Angelo, X-ray diffraction analysis of poly (vinyl alcohol) hydrogels, obtained by freezing and thawing techniques, *Macromolecules*. 37 (2004) 1921–1927. <https://doi.org/10.1021/ma035663q>.

[31] J.L. Soares-Sobrinho, M.F. De La Roca Soares, P.Q. Lopes, L.P. Correia, F.S. De Souza, R.O. Macêdo, P.J. Rolim-Neto, A preformulation study of a new medicine for chagas disease treatment: Physicochemical characterization, thermal stability, and compatibility of benznidazole, *AAPS PharmSciTech*. 11 (2010) 1391–1396. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9495-8>.

[32] K.N. Kumar, R. Padma, Y.C. Ratnakaram, M. Kang, Bright green emission from f-MWCNT embedded co-doped Bi³⁺ + Tb³⁺:polyvinyl alcohol polymer nanocomposites for photonic applications, *RSC Adv.* 7 (2017) 15084–15095. <https://doi.org/10.1039/c7ra01007a>.

[33] H.S. Mansur, C.M. Sadahira, A.N. Souza, A.A.P. Mansur, FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde, *Mater. Sci. Eng. C*. 28 (2008) 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>.

[34] H. Kang, Y. Li, M. Gong, Y. Guo, Z. Guo, Q. Fang, X. Li, An environmentally sustainable plasticizer toughened polylactide, *RSC Adv.* 8 (2018) 11643–11651. <https://doi.org/10.1039/c7ra13448g>.

[35] Y.H. Cho, B.C. Kim, K.S. Dan, Effects of propylene glycol on the physical properties of poly(vinyl alcohol) solutions and films, *Macromol. Res.* 17 (2009) 591–596. <https://doi.org/10.1007/BF03218914>.

[36] T. Huhtamäki, X. Tian, J.T. Korhonen, R.H.A. Ras, Surface-wetting characterization using contact-angle measurements, *Nat. Protoc.* 13 (2018) 1521–1538. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0003-z>.

- [37] H. Tian, D. Liu, Y. Yao, S. Ma, X. Zhang, A. Xiang, Effect of sorbitol plasticizer on the structure and properties of melt processed polyvinyl alcohol films, *J. Food Sci.* 82 (2017) 2926–2932. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13950>.
- [38] R. Krampe, J.C. Visser, H.W. Frijlink, J. Breitzkreutz, H.J. Woerdenbag, M. Preis, Oromucosal film preparations: Points to consider for patient centricity and manufacturing processes, *Expert Opin. Drug Deliv.* 13 (2016) 493–506. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1118048>.
- [39] M. Semalty, A. Semalty, G. Kumar, Formulation and characterization of mucoadhesive buccal films of glipizide, *Indian J. Pharm. Sci.* 70 (2008) 43–48. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.40330>.
- [40] S.P. Panomsuk, T. Hatanaka, T. Aiba, K. Katayama, T. Koizumi, A study of the hydrophilic cellulose matrix: Effect of indomethacin and a water-soluble additive on swelling properties, *Int. J. Pharm.* 126 (1995) 147–153. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04113-3](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04113-3).
- [41] A.M. El Sharawy, M.H. Shukr, A.H. Elshafeey, Formulation and optimization of duloxetine hydrochloride buccal films: *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Drug Deliv.* 24 (2017) 1762–1769. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1402216>.
- [42] C.M.O. Azeredo, M.J. Soares, Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth, *Rev. Bras. Farmacogn.* 23 (2013) 762–768. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500007>.
- [43] J.R. Armas, O.P. Agüero, M.P. Pacheco, Chemical composition and anti-*Trypanosoma cruzi* effect of *Thymus vulgaris* L. (thyme) essential oil and its main component, thymol, in mice, *Am. J. Pharm. Pharmacol.* 2 (2015) 21–27.
- [44] C. Villegas, M.P. Arrieta, A. Rojas, A. Torres, S. Faba, M.J. Toledo, M.A. Gutierrez, E. Zavalla, J. Romero, M.J. Galotto, X. Valenzuela, PLA/organoclay bionanocomposites impregnated with thymol and cinnamaldehyde by supercritical impregnation for active and sustainable food packaging, *Compos. Part B Eng.* 176 (2019) 107336. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107336>.
- [45] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O.C. Farokhzad, Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release, *Chem. Rev.* 116 (2016)

2602–2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>.

5 DISCUSSÃO GERAL

Apesar de o BZN ser considerado um fármaco de primeira linha para o tratamento da doença de Chagas, efeitos adversos advindos da sua administração oral podem ser observados em quase 40% dos pacientes (FERREIRA *et al.*, 2019). Fruto disto, pelo menos um quarto destes pacientes abandonam o tratamento, o que contribui para agravar ainda mais os problemas de resistência ao parasita. As altas doses necessárias para que o fármaco atinja a concentração terapêutica plasmática e a geração de metabólitos tóxicos pelo sistema citocromo P450 após a absorção do BZN pela via gastrointestinal explicam desordens de pele bem como complicações no sistema gastrointestinal e nervoso. Assim, a administração deste fármaco por rotas alternativas se mostra relevante a fim de possibilitar a redução da dose e diminuir o surgimento e intensidade de efeitos adversos.

Em um primeiro momento, testou-se a absorção do BZN pela via transdérmica em modelos de pele de orelha suína e de pele humana obtida de cirurgias de abdominoplastia. Após várias tentativas, incluindo triagens com diferentes promotores de absorção (α -bisabolol, limoneno, CTAB e Tween 80), intervalos experimentais (7, 10 e 12 h), composições de fluido receptor (etanol:PBS 20:80; PBS com 2% de Tween 80 e PG:H₂O 50:50), diferentes concentrações de fármaco (0,5; 2,5 e 5 mg mL⁻¹), além de testes com o fármaco em solução supersaturada, quantidades não significativas de fármaco foram encontradas no fluido receptor. Frente a isto, concluiu-se que a rota transdérmica não era apropriada para a administração do BZN, o que fez com que o estudo fosse direcionado para a via transbucal, que possui maior permeabilidade (NICOLAZZO; REED; FINNIN, 2005).

Nos ensaios de permeabilidade bucal, foram selecionados quatro monoterpenos (três utilizados na primeira etapa do trabalho, e um na segunda etapa) já conhecidos como agentes flavorizantes pela indústria farmacêutica e alimentícia. Além de apresentarem ação promotora de absorção, estes monoterpenos já apresentaram atividade tripanocida em estudos prévios, com destaque para o limoneno, que apresentou sinergismo com o BZN frente o *Trypanosoma cruzi* e, o timol, que demonstrou atividade em estudos *in vivo* em ratos (AZEREDO; SOARES, 2013; MORENO *et al.*, 2018; SOBRAL-SOUZA *et al.*, 2014).

Na primeira etapa deste estudo, foi realizado um pré-tratamento com os monoterpenos eugenol, carvacrol e limoneno com o objetivo de verificar qual destes compostos era mais efetivo no aumento da absorção do BZN e o tipo de interação com o epitélio bucal. O pré-tratamento com eugenol, carvacrol e limoneno, aumentou em 2,6, 2,9 e 4,9 vezes,

respectivamente, o coeficiente de permeabilidade do BZN. Observou-se também uma relação direta entre o aumento da absorção do BZN e a quantidade de fármaco retida na mucosa bucal. Ainda, foi possível perceber que, quanto menor a massa molecular e maior a lipofilicidade do monoterpene, maior a retenção do fármaco no tecido e a sua absorção. Estudos de DSC e FT-IR sugeriram que o eugenol, o monoterpene mais polar e de maior tamanho, afetou principalmente os domínios proteicos do epitélio bucal, enquanto o limoneno, monoterpene mais apolar e de menor tamanho, responsável pelo maior aumento na absorção do fármaco, interagiu preferencialmente com os domínios lipídicos mediante aumento da desordem e fluidização lipídica. Esses achados sustentam a hipótese de que o BZN seria transportado pela via transcelular, ou seja, através das células.

A partir desta triagem inicial, realizou-se o desenvolvimento e caracterização de filmes bucais de PVAL contendo BZN. O método de termoprensagem foi selecionado para a produção destes filmes por se mostrar mais adequado a formulações com BZN já que a formação de cristais de fármaco era observada quando da utilização do método de evaporação de solvente. O fármaco se mostrou estável nas condições selecionadas para a operação da termoprensa.

As imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura mostraram que os filmes obtidos são caracterizados por uma superfície homogênea, uniforme e não-porosa. Estas características são relevantes durante a aplicação, pois uma textura macia (devido à superfícies mais uniformes) evita irritação do tecido e desconforto ao paciente (TIAN *et al.*, 2019). Da mesma forma, a flexibilidade dos filmes não traz desconfortos durante os movimentos bucais e dificulta o rompimento dos mesmos (BARUA *et al.*, 2016). As características mecânicas dos filmes foram analisadas através de ensaios de força de tração e percentagem de alongamento. A presença de propilenoglicol e timol aumentou em 288 e 380 % o alongamento dos filmes antes do seu rompimento, tornando-os mais flexíveis.

A análise da morfologia dos filmes prontos por MEV, anteriormente ao estudo de permeabilidade, não demonstrou a presença de cristais de fármaco. De fato, mesmo após 90 dias de armazenamento, não foi possível observar padrões cristalográficos relativos a formas cristalinas do BZN nos filmes, sugerindo uma amorfização do material após a termoprensagem. Apesar de não ser mandatória, a completa solubilização do fármaco na matriz polimérica é vantajosa, pois permite uma distribuição mais homogênea do mesmo nos filmes (PREIS *et al.*, 2013). Ainda, a recristalização do fármaco poderia influenciar na sua solubilidade e dissolução (TIAN *et al.*, 2019), o que poderia afetar também a absorção do fármaco pelo tecido.

Os estudos de cinética de absorção de água mostraram que os filmes, em particular aqueles contendo propilenoglicol, são capazes de absorver maiores quantidades de água em umidades relativas de 50 e 75 %, em apenas 24 h, mostrando a importância de promover um armazenamento adequado para que as formulações não venham a apresentar problemas de estabilidade ou mudanças em suas propriedades.

A permeabilidade bucal do BZN administrado através dos filmes bucais foi investigada através de modelo de mucosa esofágica suína e, assim como o uso de outros monoterpenos na primeira etapa do trabalho, a adição de timol como promotor químico mostrou-se eficaz, aumentando em aproximadamente 6 vezes o coeficiente de permeabilidade do BZN em relação à solução controle. Além disso, durante os estudos de permeabilidade, os filmes contendo timol apresentaram maior erosão da matriz polimérica, evidenciada através de análises microscópicas, e não foi possível visualizar cristais do fármaco nestas amostras, o que poderia justificar o aumento de absorção observado.

Desta forma, é possível observar que a via transbucal se mostrou promissora como alternativa à administração oral do BZN, sendo que a sua absorção a partir de filmes bucais poliméricos é possível e pode ser aumentada através do uso de monoterpenos. Apesar de não ser possível estimar a concentração plasmática através dos resultados de estudos de permeabilidade *ex vivo*, devido à lacunas de estudos de biodisponibilidade do BZN, estudos recentes apontam que cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas em laboratório apresentam uma CI_{50} muito abaixo da concentração terapêutica plasmática máxima de $23 \mu\text{M}$ (6mg mL^{-1}) já estabelecida na literatura (MELLO *et al.*, 2020). Esse achado sugere que, mesmo que a absorção do BZN pela via bucal não venha a resultar em concentrações plasmáticas equivalentes aquelas obtidas pela administração oral do fármaco, ainda assim este pode ser efetivo como tratamento, considerando que não haveria uma real necessidade de concentrações terapêuticas tão altas quanto as que são descritas na literatura. Além disso, a possibilidade de sinergismo de ação já relatada do BZN com pelo menos um dos monoterpenos estudados também ofereceria suporte para uma redução de dose.

De qualquer forma, tornam-se necessários estudos *in vivo* adicionais para confirmar essas suposições. Ainda, as formulações de filmes bucais podem ser futuramente aprimoradas com a adição de camadas poliméricas que proporcionem maior força de mucoadesão, como a quitosana, ou até mesmo de camadas impermeáveis, de forma com que a liberação do fármaco seja unidirecional (apenas na direção da mucosa bucal).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Alta permeabilidade transbucal do BZN foi encontrada, particularmente na presença de terpenos, sugerindo que a mucosa bucal é promissora para a sua administração.

- O limoneno, monoterpeneo de menor massa molecular e maior valor de log P (maior lipofilicidade) foi o promotor de absorção mais efetivo, aumentando o coeficiente de permeabilidade do BZN em 4,9 vezes em relação à solução controle, além de aumentar a retenção do fármaco no tecido em 3,1 vezes.

- Estudos mecanísticos de FT-IR e DSC sugerem que o aumento da permeabilidade do BZN na presença de promotores de absorção está relacionado a interações com domínios lipídicos do epitélio bucal, promovendo maior desordem e fluidização dos mesmos. Este achado aponta para a possibilidade de absorção do fármaco pela rota transcelular.

- Os filmes bucais de BZN baseados em matriz polimérica de PVAL produzidos pelo método de termoprensagem mostraram ter uma superfície homogênea, uniforme e não porosa durante a análise microscópica.

- A espessura dos filmes mostrou baixa variabilidade para diferentes regiões de cada filme, o que também sugere a obtenção de sistemas uniformes.

- Análises de DRX mostraram que o BZN permaneceu em sua forma amorfa na matriz polimérica, sem apresentar recristalização mesmo após 90 dias de armazenamento, o que sugere que o método de termoprensagem foi eficiente para o preparo de filmes de PVAL com BZN.

- A adição de propilenoglicol e timol em concentrações de 3% confere aos filmes as características mecânicas desejadas de flexibilidade, resistência e suavidade, aumentando em até 380% o alongamento dos filmes antes do rompimento.

- A adição de timol proporcionou maior erosão dos filmes, sem formação visível de cristais durante os estudos de permeabilidade *ex vivo*, o que pode estar relacionado ao aumento de absorção do fármaco.

- A presença de propilenoglicol e timol também trouxe um aumento na taxa de sorção de água pelos filmes em umidades relativas de 50 e 75% em período de 24 h, mostrando a necessidade de um armazenamento adequado para os filmes.

- A presença de timol nos filmes foi capaz de aumentar em cerca de 6 vezes o coeficiente de permeabilidade do BZN em relação à solução controle.

- Os resultados sugerem que a administração de BZN através de filmes bucais poliméricos baseados em PVAL se mostrou promissora como alternativa para evitar os problemas relacionados à administração oral deste fármaco. A adição de propilenoglicol como plastificante e do monoterpene timol se mostrou vantajosa tanto no aumento de absorção do fármaco quanto na melhora das propriedades mecânicas dos filmes.

REFERÊNCIAS

AZEREDO, Camila M. O.; SOARES, Maurilio J. Combination of the essential oil constituents citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 762–768, 2013. DOI: 10.1590/S0102-695X2013000500007.

BARUA, Sonia; KIM, Hyeongmin; JO, Kanghee; SEO, Chang Won; PARK, Tae Jun; LEE, Kyung Bin; YUN, Gylae; OH, Kyungsoo; LEE, Jaehwi. Drug delivery techniques for buccal route: formulation strategies and recent advances in dosage form design. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 46, n. 7, p. 593–613, 2016. DOI: 10.1007/s40005-016-0281-9.

FERREIRA, Ariela Mota; DAMASCENO, Renata Fiúza; MONTEIRO-JUNIOR, Renato Sobral; OLIVEIRA, Igor Antônio Costa De; PRATES, Thalita Emily Cezário; NUNES, Maria Carmo Pereira; HAIKAL, Desirée Sant’Ana. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 27, n. 3, p. 354–362, 2019. DOI: 10.1590/1414-462x201900030456.

MELLO, Francisco do Vale Chaves et al. Novel nitroimidazole derivatives evaluated for their trypanocidal, cytotoxic, and genotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 186, p. 111887, 2020. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111887.

MORENO, Érika Marcela; LEAL, Sandra Milena; STASHENKO, Elena E.; GARCÍA, Liliana Torcoroma. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 225, 2018. DOI: 10.1186/s12906-018-2293-7.

NICOLAZZO, Joseph A.; REED, Barry L.; FINNIN, Barrie C. Buccal penetration enhancers—How do they really work? **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 1–2, p. 1–15, 2005. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.01.024.

PREIS, Maren; WOERTZ, Christina; KLEINEBUDDE, Peter; BREITKREUTZ, Jörg. Oromucosal film preparations: Classification and characterization methods. **Expert Opinion on Drug Delivery**. Taylor & Francis, , 2013. DOI: 10.1517/17425247.2013.804058.

SOBRAL-SOUZA, Celestina E. et al. Cytotoxic and antiparasitic *in vitro* activities of α -pinene and carvacrol. **Acta Toxicológica Argentina**, 2014.

TIAN, Yu *et al.* Oromucosal films: from patient centricity to production by printing techniques. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 9, p. 981–993, 2019. DOI: 10.1080/17425247.2019.1652595.