

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

MARINA FRANÇA DIAS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
QUIMIOPREVENTIVA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO  
IMIQUIMODE EM MODELO MURINO DE CÂNCER DE PELE**

Belo Horizonte  
2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:     Dissertação     Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

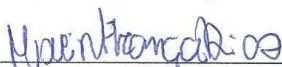
Nome completo do autor: Marina França Dias

Título do trabalho: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUIMIO-  
PREVENTIVA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO IMIQUIMODE EM MODELO  
MURINO DE CÂNCER DE PELE

3. Informações de acesso ao documento:


Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:



<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

Marina França Dias

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
QUIMIOPREVENTIVA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO  
IMIQUIMODE EM MODELO MURINO DE CÂNCER DE PELE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade  
Federal de Goiás, como requisito à obtenção do  
grau de Doutor em Nanotecnologia Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Armando Silva Cunha Júnior

Belo Horizonte  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Dias, Marina França  
DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
QUIMIOPREVENTIVA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO  
IMIQUIMODE EM MODELO MURINO DE CÂNCER DE PELE  
[manuscrito] / Marina França Dias. - 2018.  
xi, 102 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Cunha Silva; Júnior; co orientadora Sílvia Ligório Fialho.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Goiânia, 2018.  
Bibliografia. Anexos.  
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. câncer de pele. 2. nanopartículas. 3. imiquimode. 4. atividade antiangiogênica. 5. quimioprevenção. I. Silva, Júnior, Armando da Cunha, orient. II. Título.

CDU 615



### ATA DA DEFESA DE TESE

No dia 11 de abril de 2018, ocorreu a Defesa de Tese da aluna **Marina França Dias** no **Programa de Pós-graduação em Nanotecnologia Farmacêutica**, em sessão presidida e registrada pelo Orientador **Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior**. A Tese teve como título: **Desenvolvimento e avaliação da atividade quimiopreventiva de nanopartículas contendo imiquimode em modelo murino de câncer de pele**. De acordo com o Regimento do Programa, o processo de defesa de tese constou de duas etapas: na primeira ocorreu a apresentação oral do estudo realizado e na segunda a sustentação do mesmo frente à arguição dos membros da Banca Examinadora. O Presidente da Banca Examinadora deu início aos trabalhos, com a abertura formal às 13:30 horas, na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) – Auditório da DPD, com a leitura da **Portaria n.º. 05/2018**, de designação da Banca Examinadora, assinada pela Coordenadora Geral do PPGNANOFARMA. A seguir, passou a palavra à doutoranda, que apresentou seu trabalho, durante 45 minutos. Após sua exposição, foi dada a palavra aos membros da Banca Examinadora, para que procedessem à arguição da doutoranda, com respostas a cada um dos examinadores. Concluída esta fase, registraram-se as possíveis sugestões de alterações necessárias ao texto. De acordo com a avaliação dos membros da Banca Examinadora, a doutoranda **Marina França Dias** foi  **aprovado(a)**;  **aprovado(a) com alterações** ou  **reprovado(a)**. A aprovação será válida desde que sejam satisfeitas as condições exigidas pelos membros da Banca Examinadora, com entrega da versão final da tese, referendada pelo Professor Orientador, até o prazo máximo de  **30 (trinta)** ou  **60 (sessenta)** dias na Secretaria Local do Programa, a contar da presente data. A doutoranda está ciente de que somente poderá usufruir de todos os direitos e prerrogativas que o Título de Doutor lhe confere quando da Homologação da Ata em Reunião da Coordenadoria Geral do PPGNANOFARMA, após entrega da documentação exigida para formação do processo de concessão do Diploma de Doutor na Universidade Federal de Goiás.

Belo Horizonte, 11 de abril de 2018.

#### Nome e Assinatura da Banca Examinadora:

| Membros  | Assinaturas |
|--|-------------|
| Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior<br>(PPG NanoFarma/FF/UFMG) - Presidente                    |             |
| Profa. Dra. Eliana Martins Lima<br>(PPG NanoFarma/FF/UFMG) - Titular                               |             |
| Profa. Dra. Silvia Ligório Fialho<br>(Fundação Ezequiel Dias – FUNED) – Titular                    |             |
| Profa. Dra. Rogéria Serakides<br>(Escola de Veterinária da UFMG) - Titular                         |             |
| Prof. Dr. André Luis Branco de Barros<br>(UFMG) - Titular  |             |
| Prof. Dr. Bruno Gonçalves Pereira<br>(Fundação Ezequiel Dias – FUNED) - Titular                    |             |
| Profa. Dra. Elionai Cassiana De Lima Gomes<br>(Dept. Química – Inst. C. Exatas UFMG) -<br>Suplente |             |
| Prof. Dr. Renes Resende Machado<br>(FF- UFMG) - Suplente   |             |

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Armando da Silva Cunha Júnior, pela oportunidade e confiança.

À Dra. Sílvia Ligório Fialho, pela amizade, pela motivação e pelo apoio essencial para realização desse trabalho.

À Júlia e à Bruna, alunas de iniciação científica, por toda ajuda e convivência.

Aos amigos do SDTF, Carol, Marcos, Ivanildes, Brenda, Ana, Oliver e Celda, por toda colaboração.

À Luciana, do laboratório de Biologia Celular, pelas sugestões e por disponibilizar o laboratório.

A todos da DCF e do SRVO, especialmente, à Viviam, à Cláudia e Priscila, por disponibilizarem o laboratório, os equipamentos e por estarem sempre dispostas a ajudar.

A todos do laboratório de farmacotécnica da FUNED, Bruno, Milena, Guilherme, Yara, Thomas, Madalena, Eliane e Darilson, pela convivência e ajuda no início do meu trabalho.

Ao DCQ, por disponibilizarem os equipamentos e pela ajuda nas análises do CG

A todos do LTF, especialmente à Mayara, Graciele e Lorena, pelo companheirismo, e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao professor Wagner Mussel e às professoras Irene e Elionai da UFMG, pela ajuda nas análises de Difractometria de raio X, Termogravimetria, Calorimetria exploratória diferencial e Infra-Vermelho.

Ao Dário do biotério da FUNED, pelo cuidado e ajuda no experimento *in vivo*.

A todos os meus familiares, por todo apoio e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo e ao Programa de Pós-Graduação, pela oportunidade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

---

O câncer de pele é o de maior incidência dentre todos os tipos de neoplasias e a tendência é o aumento crescente do número de novos casos nas próximas décadas, tornando necessárias novas modalidades e opções de tratamento. O agente quimioterápico imiquimode é utilizado no tratamento da doença, mas a elevada ocorrência de efeitos adversos locais e sistêmicos associados ao seu uso bem como sua baixa permeação cutânea prejudicam a adesão e a efetividade terapêutica, respectivamente. O objetivo do presente trabalho foi comparar a atividade quimiopreventiva do imiquimode veiculado em nanocápsulas com a da sua forma comercial, em modelo murino de câncer de pele. Nanocápsulas poliméricas contendo o imiquimode, na ausência e presença de revestimento de quitosana, foram obtidas pela técnica de precipitação do polímero pré-formado e caracterizadas quanto à eficiência de encapsulação, ao tamanho, ao potencial zeta, ao pH, à morfologia (microscopia eletrônica de transição e varredura), à espectrofotometria de varredura óptica e à liberação *in vitro* através de membrana de diálise em tampão pH 5,6. A presença de interações entre componentes da formulação foi avaliada por meio de análises termogravimétricas e por espectroscopia na região do infravermelho. A detecção de estruturas cristalinas nas formulações foi realizada por difratometria de raios X. A atividade antiangiogênica das nanocápsulas obtidas, bem como da formulação comercial do imiquimode, foi determinada em modelo de membrana corioalantoica de embrião de galinha. A permeação cutânea das nanopartículas e do imiquimode comercial foi determinada em camundongos Swiss. A atividade quimiopreventiva das nanocápsulas obtidas e a do imiquimode comercial foi avaliada por meio da inibição tumoral promovida por esses tratamentos em modelo de carcinogênese química em camundongos Swiss. A eficiência de encapsulação, o diâmetro médio, o potencial zeta e o pH das nanocápsulas não revestidas contendo imiquimode foram respectivamente de  $92,5\% \pm 0,4$ ;  $249 \pm 22,4$  nm;  $-40,1$  mV  $\pm 3,7$  e  $5,4 \pm 0,01$ . Enquanto que, para as nanocápsulas com recobrimento catiônico os parâmetros encontrados foram  $88,6 \pm 2,3\%$ ;  $287,0 \pm 12,6$  nm;  $+11,3 \pm 0,5$  mV e  $3,7 \pm 0,0$ , respectivamente. A morfologia das formulações, obtida pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, confirmou a presença de nanocápsulas. Nas análises de estabilidade por espectrofotometria de varredura óptica (Turbiscan), todas as dispersões obtiveram variação de retroespalhamento inferior a 2%, no período de cinco semanas, sendo consideradas estáveis. No ensaio de liberação *in vitro*, as nanopartículas contendo imiquimode obtiveram liberação mais lenta do fármaco comparativamente ao imiquimode livre (em solução) e ao imiquimode comercial. Foram verificadas interações entre a quitosana e os demais componentes das formulações nos estudos termogravimétricos e na espectroscopia na região do infravermelho. Não foi detectada presença de estrutura cristalina com emprego da técnica de difratometria de raios X para a formulações contendo imiquimode com e sem revestimento. A dispersão de nanocápsulas contendo imiquimode apresentou atividade antiangiogênica superior à da formulação comercial em modelo de

membrana corioalantoica de embrião de galinha. As nanocápsulas contendo imiquimode com e sem revestimento apresentaram permeação cutânea em camadas profundas da pele e inibição no processo de carcinogênese quimicamente induzido superior à do grupo-controle tumoral e à dos grupos tratados com nanopartículas placebo, enquanto a formulação comercial apresentou retenção do fármaco em camadas mais superficiais da pele e não obteve redução estatisticamente significativa no número de papilomas formados em relação ao controle cancerígeno. Esses resultados permitem concluir, portanto, que nanocarreadores estáveis foram obtidos e que a atividade quimiopreventiva e o efeito antiangiogênico desses sistemas representam uma alternativa promissora para o tratamento de neoplasias cutâneas.

**Palavras-chaves:** câncer de pele; nanopartículas; imiquimode; atividade antiangiogênica; quimioprevenção.

## ABSTRACT

---

Skin cancer has the highest incidence among all types of neoplasms and the tendency is the increasing number of new cases in next decades, which makes necessary new modalities and treatment options. Chemotherapeutic agent imiquimod is used in treatment of disease, but the high occurrence of local and systemic adverse effects associated with its use as well as its low skin permeation impair adherence and therapeutical effectiveness, respectively. The aim of the present work was evaluate the antitumor activity of nanocapsules imiquimod-loaded compared to its commercial product in murine model of skin cancer. Polymeric nanocapsules containing imiquimod, in the absence and presence of chitosan coating, were obtained by the precipitation of preformed polymer technique and characterized by encapsulation efficiency, size, zeta potential, pH, morphology (transmission electron microscopy and scanning), optical scanning spectrophotometry and *in vitro* release through dialysis membrane in pH 5.6 buffer. Presence of chemical interactions between formulation components was evaluated by thermogravimetric analysis and infrared spectroscopy. Detection of crystalline structures was performed by X-ray diffractometry. The nanocapsules and commercial imiquimod formulation antiangiogenic activity was determined in a chicken embryo chorioallantoic membrane model. Cutaneous permeation of nanocapsules imiquimod-loaded and commercial imiquimod was determined in Swiss albino mice. The chemopreventive activity of colloidal dispersions and the commercial imiquimod was evaluated through the tumoral inhibition promoted by these treatments in a multi-stage model of chemical carcinogenesis in Swiss mice. Encapsulation efficiency, mean diameter, zeta potential and pH of uncoated nanocapsules imiquimod-loaded were  $92.5\% \pm 0.4$ ;  $249 \pm 22.4$  nm;  $-40.1$  mV  $\pm 3.7$  and  $5.4 \pm 0.01$  respectively, whereas for nanocapsules with cationic coating the parameters found were:  $88.6 \pm 2.3\%$ ;  $287.0 \pm 12.6$  nm;  $+ 11.3 \pm 0.5$  mV and  $3.7 \pm 0.0$ , respectively. The formulations morphology obtained by scanning and transmission electron microscopy images confirmed the presence of nanocapsules. In the stability analysis by optical scanning spectrophotometry (Turbiscan), all dispersions obtained a backscattering variation less than 2% over 5 weeks and were considered stable. In the *in vitro* release assay, imiquimod-loaded nanoparticles obtained slower release of the drug compared to free and commercial imiquimod. There were chemical interactions between chitosan and other formulation components evaluated by thermogravimetric and infrared studies. No crystalline structure was detected by the X-ray diffraction technique for the coated and uncoated imiquimod formulation. The dispersion of nanocapsules containing imiquimod presented antiangiogenic activity superior than commercial formulation in chicken embryo chorioallantoic membrane model. Nanocapsules containing imiquimod both uncoated and coated with chitosan presented cutaneous permeation in deep layers of the skin and inhibition in the chemically induced carcinogenicity process superior than tumor control group and groups treated with placebo nanoparticles while the commercial formulation presented retention of the drug in superficial layers of the skin and did not obtain a statistically significant reduction in the number of papillomas formed compared to the carcinogenic control. These results allow to conclude, therefore, that stable nanocarreadores were obtained and the chemopreventive activity and the antiangiogenic effect of these systems represent a promising alternative for the treatment of cutaneous neoplasias.

**Key words:** skin cancer; nanoparticles; imiquimod; antiangiogenic activity; chemoprevention.

## LISTA DE FIGURAS

---

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Figura 1 – Anatomia e camadas da pele.....   | 4             |
| Figura 2 – Anatomia e camadas da epiderme.....   | 5             |
| Figura 3 – Vias de absorção cutânea para fármacos de uso tópico. ....  | 7             |
| Figura 4 – Tipos de câncer de pele.....  | 10            |
| Figura 5 – Modelo de carcinogênese química em camundongos realizado em duas etapas.....  | 13            |
| Figura 6 – Estrutura química do imiquimode.....  | 14            |
| Figura 7 – Mecanismos de ação do imiquimode em receptores TLR.....   | 17            |
| Figura 8 – Nanocarreadores poliméricos. ....   | 19            |
| Figura 9 – Fórmula estrutural da quitosana.....  | 23            |
| Figura 10 – Fórmula estrutural e produtos da hidrólise do PLGA.....  | 24            |
| Figura 11 – Fórmula estrutural do PCL.....   | 24            |
| Figura 12 – Fórmula estrutural da polimetacrilatos. ....   | 25            |
| Figura 13 – (A) Cromatograma do imiquimode a 25 µg/mL; (B) Cromatograma fase móvel; (C) Cromatograma do diluente; (D) Cromatograma do placebo; e (E) Cromatograma do placebo fortificado ..... | 32            |
| Figura 14 – Curva analítica de calibração do padrão de trabalho de imiquimode na faixa de 0,005 a 0,04 mg/mL.....  | 34            |
| Figura 15 – Preparo de nanocápsulas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.....  | 38            |
| Figura 16 – Representação esquemática de detecção da luz transmitida e retroespalhada pelo Turbiscan Lab Expert.....   | 44            |
| Figura 17 – Imagens observadas em microscópio óptico e perfis de difratometria a <i>laser</i> das formulações selecionadas.....  | 47            |
| Figura 18 – Imagens das formulações desenvolvidas.....   | 48            |
| Figura 19 – Morfologia NPImq determinada por MEV (A) e (B) e por MET (C) morfologia da NPQTImq determinada por MET (D).....  | 49            |
| Figura 20 – Curva TG/DTG e DTA (A) Imq puro, (B) mistura física Imq:TCM:eudragit® L100:quitosana (C) TCM, (D) eudragit® L100, (E) NPQTImq e (F) quitosana....                                  | 50            |
| Figura 21 – Curvas DSC das formulações NPImq (acima) e NPQTImq.....  | 52            |
| Figura 22 – Difratometria de raios X do imiquimode puro, eudragit® L100 e quitosana.....   | 53            |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 23 – Difractometria de raios X das formulações NPImq e NPQTImq. ....  | 54  |
| Figura 24 – Espectro IR dos polímeros eudragit® L100 e quitosana puros e das misturas 1:1.....   | 55  |
| Figura 25 – Curvas de distribuição de tamanho das formulações desenvolvidas após preparo. ....   | 58  |
| Figura 26 – Curvas de distribuição de tamanho das formulações desenvolvidas 35 dias após preparo.....  | 59  |
| Figura 27 – Potencial zeta das dispersões de nanopartículas após o preparo.....  | 62  |
| Figura 28 – Potencial zeta das dispersões de nanopartículas 35 dias após o preparo.....  | 63  |
| Figura 29 – Cromatogramas obtidos na análise por cromatografia gasosa do padrão de 5.000 ppm de acetona e 3.000 ppm de metanol e das formulações de nanopartículas desenvolvidas. .... | 64  |
| Figura 30 – Perfis de retroespalhamento das formulações de NP analisadas pelo equipamento Turbiscan Lab®, no período de até 35 dias após o preparo. ....                               | 66  |
| Figura 31 – Perfis de liberação <i>in vitro</i> do Imq em solução, Imq comercial diluída e das dispersões de NPImq e NPQTImq. ....   | 67  |
| Figura 32 – Representação esquemática do ensaio em CAM.....  | 70  |
| Figura 33 – Percentual de vascularização em ensaio de CAM para Imq comercial diluído e formulações desenvolvidas. ....   | 72  |
| Figura 34 – Análise histopatológica de CAM (40 e 100X) [EC (Ectoderme) ME (Mesoderme) VS (vaso sanguíneo)]......   | 74  |
| Figura 35 – Curvas de distribuição de tamanho das formulações NPImq e NPQTImq 0 e 48 horas após diluição em tampão pH 7,4. ....  | 75  |
| Figura 36 – Curva de titulação pH versus Potencial Zeta da formulação NPQTImq .....  | 814 |
| Figura 37 – Representação esquemática da indução tumoral realizada. ....   | 81  |
| Figura 38 – Permeação cutânea de formulações contendo Imq. ....  | 81  |
| Figura 39 – Imagem representativa dos grupos experimentais do estudo <i>in vivo</i> .....  | 83  |
| Figura 40 – Número médio de tumores por camundongo referente as formulações testadas. ....   | 84  |
| Figura 41 – Distribuição do diâmetro dos tumores por grupo experimental.....   | 86  |
| Figura 42 – Análise histopatológica de pele de camundongo (aumento de 20x) [EP (Epiderme) D (Derme) SC (estrato córneo) PC (pérola córnea) IF (infiltrado inflamatório)]. ....         | 88  |

## LISTA DE TABELAS

---

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Tabela 1 – Valores de média, desvio-padrão e Coeficiente de Variância obtidos na análise de precisão do método analítico desenvolvido.....                                     | 35            |
| Tabela 2 – Valores de média, desvio-padrão, porcentagem de recuperação e erro-padrão relativo, obtidos na análise de exatidão do método analítico desenvolvido .....           | 35            |
| Tabela 3 – Valores das áreas obtidas na análise de estabilidade das amostras no período de 24 horas.....   | 36            |
| Tabela 4 – Composição das formulações de nanocápsulas testadas. ....   | 46            |
| Tabela 5 – Valores de pH obtidos para formulações desenvolvidas nos intervalos de 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após preparo.....   | 56            |
| Tabela 6 – Valores de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão obtidos para as dispersões desenvolvidas nos intervalos de 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após preparo..... | 57            |
| Tabela 7 – Potencial zeta das dispersões de nanopartículas 35 dias após preparo.....   | 61            |
| Tabela 8 – Áreas obtidas na análise por cromatografia gasosa do padrão de 5.000 ppm de acetona e 3.000 ppm de metanol e das formulações de nanopartículas desenvolvidas .....  | 64            |

## LISTA DE QUADROS

---

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Quadro 1 – Medicamentos tópicos emergentes no tratamento do câncer de pele .....   | 12            |
| Quadro 2 – Solubilidade do imiquimode em diferentes solventes .....  | 14            |
| Quadro 3 – Composição imiquimode creme .....   | 14            |
| Quadro 4 – Estudos clínicos de produtos contendo o imiquimode ou associações para tratamento de lesões cutâneas .....  | 15            |
| Quadro 5 – Estudos utilizando nanopartículas para uso tópico. ....   | 21            |
| Quadro 6 – Parâmetros cromatográficos USP <i>versus</i> método proposto para quantificação do imiquimode .....   | 29            |
| Quadro 7 – Composição e variáveis testadas no desenvolvimento das formulações de nanocápsulas.....   | 39            |
| Quadro 8 – Parâmetros cromatográficos para análise de resíduo de metanol e acetona nas formulações de nanocápsulas de imiquimode com e sem revestimento de quitosana. .... | 42            |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

|         |  |
|---------|--|
| μL      | Microlitro   |
| μm      | Micrômetro   |
| ANVISA  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                 |
| APC     | Células apresentadoras de antígenos                      |
| BS      | Varição de <i>Backscattering</i>                         |
| CAM     | Membrana corioalantoica                                  |
| CBC     | Carcinoma basocelular                                    |
| CEC     | Carcinoma espinocelular                                  |
| CG-MS   | <i>Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>       |
| CLAE    | Cromatografia líquida de alta eficiência                 |
| CMV     | Citomegalovírus  |
| COX-2   | Ciclooxigenase-2   |
| CV      | Coeficiente de variação                                  |
| DL      | Difratometria à laser                                    |
| DLS     | <i>Dynamic light scattering</i>                          |
| DMBA    | 7,12-dimetilbenz(a)antraceno                             |
| DSC     | Calorimetria exploratória diferencial                    |
| DTA     | Análise térmica diferencial                              |
| DTG     | Primeira derivada da curva TG                            |
| DP      | Desvio-padrão  |
| EC      | Estrato córneo   |
| EE%     | Eficiência de encapsulação                               |
| EPR     | Erro padrão relativo                                     |
| FA      | Fase aquosa  |
| FDA     | <i>Food And Drug Administration</i>                      |
| F-ANOVA | Teste estatístico de desvio de linearidade               |
| FO      | Fase orgânica  |
| GC-SF   | <i>Granulocyte colony-stimulating facto</i>              |
| GM-CSF  | <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>  |
| IFN     | Interferon   |
| IL      | Interleucina   |
| Imq     | Imiquimode   |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| IP      | Índice de polidispersão                                  |

|                |   |
|----------------|---|
| Kda            | <i>Kilodalton</i>   |
| ME             | Mesoderme   |
| MET            | Microscopia eletrônica de transmissão                                   |
| MEV            | Microscopia eletrônica de varredura                                     |
| Mg             | Miligrama   |
| Min            | Minuto  |
| MI             | Mililitro   |
| MMQ            | Método dos mínimos quadrados  |
| <i>NK</i>      | <i>Natural killers</i>  |
| NP             | Nanopartículas  |
| NPImq          | Nanopartículas contendo imiquimode                                      |
| NPPlacebo      | Nanopartícula sem imiquimode  |
| NPQTImq        | Nanopartículas poliméricas revestidas com quitosana contendo imiquimode |
| NPQTPlacebo    | Nanopartículas resvestidas com quitosana sem imiquimode                 |
| PLC            | Poli-caprolactona   |
| PLGA           | Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)                                 |
| p/v            | Peso por volume   |
| pH             | Potencial hidrogeniônico  |
| Ppm            | Partes por milhão   |
| R <sup>2</sup> | Coeficiente de determinação   |
| RNA            | Ácido ribonucleico  |
| RUV            | Radiação ultravioleta   |
| R-837          | Imiquimode  |
| S-26308        | Imiquimode  |
| TCM            | Triglicerídeos de cadeia média  |
| Teste F        | Teste Fischer-Snedecor  |
| TG             | Termogravimetria  |
| TLR            | Receptores <i>toll like</i>   |
| TNF            | Fator de necrose tumoral  |
| IV             | Infravermelho   |
| UV             | Ultravioleta  |
| 5-FU           | 5-Fluorouracil  |

# SUMÁRIO

---

|  | Página |
|--|--------|
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 1      |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA .....  | 3      |
| 2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE .....  | 3      |
| 2.1.1 Pele .....   | 3      |
| 2.2 ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE MEDICAMENTOS.....  | 6      |
| 2.2.1 Vias de absorção cutânea .....   | 7      |
| 2.3 CÂNCER DE PELE.....  | 8      |
| 2.3.1 Tratamentos tópicos para o câncer de pele .....  | 10     |
| 2.4 MODELO DE CARCINOGENESE QUÍMICA MULTITAPAS EM PELE DE<br>CAMUNDONGO.....                           | 12     |
| 2.5 IMIQUIMODE.....  | 14     |
| 2.5.1 Mecanismos de ação .....   | 16     |
| 2.6 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....  | 18     |
| 2.6.1 Nanopartículas poliméricas para uso tópico.....  | 20     |
| 2.6.2 Polímeros utilizados em nanocarreadores para uso tópico .....                                    | 22     |
| 3 OBJETIVOS .....  | 27     |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....  | 27     |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 27     |
| 4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE<br>PARA QUANTIFICAÇÃO DO IMIQUIMODE .....   | 28     |
| 4.1 MATERIAL E MÉTODOS .....   | 28     |
| 4.1.1 Material .....   | 28     |
| 4.1.2 Equipamentos .....   | 28     |
| 4.1.3 Métodos .....  | 28     |
| 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 31     |
| 4.2.1 Validação do método analítico para quantificação de imiquimode em<br>nanocápsulas por CLAE ..... | 31     |
| 4.3 CONCLUSÃO .....  | 36     |
| 5 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS<br>POLIMÉRICAS CONTENDO IMIQUIMODE.....           | 37     |
| 5.1 MATERIAL E MÉTODOS .....   | 37     |
| 5.1.1 Material .....   | 37     |
| 5.1.2 Equipamentos .....   | 37     |
| 5.1.3 Métodos .....  | 38     |
| 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 45     |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 5.2.1  | Preparo de nanocápsulas contendo imiquimode.....  | 45  |
| 5.2.2  | Morfologia.....   | 48  |
| 5.2.3  | Análises térmicas .....   | 49  |
| 5.2.4  | Difração de raios X.....  | 52  |
| 5.2.5  | Espectroscopia na região do infravermelho .....   | 54  |
| 5.2.6  | pH.....   | 55  |
| 5.2.7  | Distribuição de diâmetro e índice de polidispersão (IP) .....   | 56  |
| 5.2.8  | Potencial zeta.....   | 60  |
| 5.2.9  | Solvente residual.....  | 63  |
| 5.2.10 | Eficiência de encapsulação.....   | 65  |
| 5.2.11 | Caracterização ótica por espalhamento múltiplo de luz .....   | 65  |
| 5.2.12 | Estudo de liberação <i>in vitro</i> .....   | 66  |
| 5.3    | CONCLUSÃO .....   | 68  |
| 6      | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS<br>CONTENDO IMIQUIMODE .....   | 69  |
| 6.1.   | MATERIAL E MÉTODOS .....  | 69  |
| 6.1.1  | Material .....  | 69  |
| 6.1.2  | Equipamentos .....  | 69  |
| 6.1.3  | Método .....  | 69  |
| 6.2    | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 71  |
| 6.3    | CONCLUSÃO .....   | 77  |
| 7      | AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA E DA ATIVIDADE<br>QUIMIOPREVENTIVA DAS NANOPARTÍCULAS DESENVOLVIDAS EM<br>MODELO MURINO DE CARCINOGENESE QUÍMICA..... | 78  |
| 7.1    | Material.....   | 78  |
| 7.2    | Equipamentos.....   | 78  |
| 7.3    | Métodos .....   | 79  |
| 7.3.1  | Permeação cutânea de formulações contendo Imq .....   | 79  |
| 7.3.2  | Ação quimiopreventiva de formulações contendo Imq .....   | 79  |
| 7.3.2  | Análise estatística .....   | 81  |
| 7.4    | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 81  |
| 7.4.1  | Permeação cutânea de formulações contendo Imq .....   | 81  |
| 7.4.2  | Ação quimiopreventiva de formulações contendo Imq .....   | 83  |
| 9      | CONCLUSÕES .....  | 89  |
| 9      | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 90  |
|        | ANEXO.....  | 102 |
|        | ANEXO A – Ofício de aprovação do projeto para teste <i>in vivo</i> pelo Comitê de Ética<br>da Funed .....   | 103 |

# 1 INTRODUÇÃO

---

O câncer de pele, tanto o tipo melanoma como não melanoma, é o de maior incidência dentre todos os tipos de câncer e a tendência é o aumento crescente do número de novos casos nas próximas décadas (SHARMA et al., 2016). Isso se deve principalmente às mudanças ambientais, no estilo de vida da população e ao fato de que o epitélio é cronicamente exposto à carcinógenos como fumaça de tabaco, substâncias químicas e radiação solar que configuram as principais causas no desenvolvimento da doença (SAINI et al., 2010; SHARMA et al., 2016).

Inúmeras opções terapêuticas estão disponíveis para o tratamento de neoplasias cutâneas (AGUAYO-LEIVA et al., 2010), incluindo a excisão simples, cirurgia micrográfica de Mohs, crioterapia, curetagem, laser, radioterapia, terapia fotodinâmica, imunoterapia e quimioterapia (OLDFIELD et al., 2005; SAVOIA et al., 2016).

Apesar do elevado número de alternativas e dos avanços nas terapias de neoplasias epiteliais (SHARMA et al., 2016), falhas nos resultados clínicos são recorrentes além do alto custo desses tratamentos (SHAN et al., 2016). Nessas condições, a quimioprevenção, ou seja, o uso de produtos que auxiliem na prevenção ou inibição do desenvolvimento de lesões tumorais, é uma estratégia promissora (SAINI et al., 2010).

Um grande número de compostos tem sido avaliado quanto a sua atividade quimiopreventiva, sendo desejável que tais componentes tenham baixa toxicidade, efeitos adversos reduzidos ou ausentes, sejam efetivos em baixas dosagens e de fácil administração (PENNY et al., 2015).

O imiquimode (Imq) da classe das imidazoquinolinas, é um composto imunomodulador e foi aprovado pelo FDA em 2004 em formulação de uso tópico para o tratamento de carcinoma basocelular superficial (MACEDO et al., 2007). No entanto, estudos realizados demonstram também o potencial do Imq, no tratamento de outros tipos de lesões cutâneas, como lentigo maligno (HYDE et al., 2012); hemangiomas (McCUAIG et al., 2009) e metástases cutâneas de câncer de mama (ADAMS et al., 2012) dentre outras.

Apesar das vantagens do uso tópico do medicamento contendo Imq como facilidade de aplicação pelo paciente, de ser menos doloroso e dispensioso que processos cirúrgicos e de sua eficácia terapêutica (LACARRUBA et al., 2008), existem

algumas limitações associadas ao uso do Imq creme. Dentre essas estão efeitos adversos que podem prejudicar a adesão dos pacientes ao tratamento (KARVE et al., 2008) e sua baixa permeação cutânea, essencial para que o fármaco atinja as células epidérmicas e exerça sua atividade antitumoral (TELÓ et al., 2016).

Em estudo realizado por Karve et al. (2008), mais de 50% dos pacientes tratados com Imq creme reportaram pelo menos um evento adverso durante o período do estudo, sendo os mais comuns reações no local do tumor (coceira, ardor, irritação, sensibilidade e hipopigmentação). Outros efeitos adversos também observados foram eritema, erosões, pústulas, edema, endurecimento e descamação da pele (KARVE et al., 2008).

Em outro trabalho, o fluxo da permeação cutânea do Imq à 0,1% em ensaio *in vitro* utilizando pele de camundongo e de porco foi de apenas 0,1 e 0,002  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$  do fármaco, respectivamente, sendo que o fluxo considerado capaz de promover benefícios terapêuticos no uso clínico é de 0,79  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hora}$ . Para que se atinja a permeação desejada torna-se necessário prolongar o período de tratamento ou aumentar a frequência de aplicação, o que leva invariavelmente ao aumento de efeitos adversos e descontinuação da terapia (LEE et al., 2011).

Visando a melhora da permeação cutânea do Imq, redução dos efeitos adversos e consequente aumento da adesão dos pacientes ao tratamento, a veiculação do fármaco em sistemas nanoestruturados, como lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas poliméricas pode ser uma alternativa. Esses sistemas permitem a liberação controlada do fármaco, podem protegê-lo contra a degradação em seu sítio ativo e também aumentar sua concentração intracelular nas células-alvo, reduzindo os efeitos adversos e melhorando sua eficácia (KAIREMO et al., 2008; SEVERINO et al., 2013; TELÓ et al., 2016).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a incorporação do Imq em nanopartículas poliméricas para uso tópico, caracterização físico-química, determinação da ação antiangiogênica da formulação desenvolvida e avaliação da atividade quimiopreventiva desse sistema em modelo químico de carcinogênese cutânea. A análise desses parâmetros foi realizada comparativamente ao Imq comercial.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 ANATOMIA E FISILOGIA DA PELE

#### 2.1.1 Pele

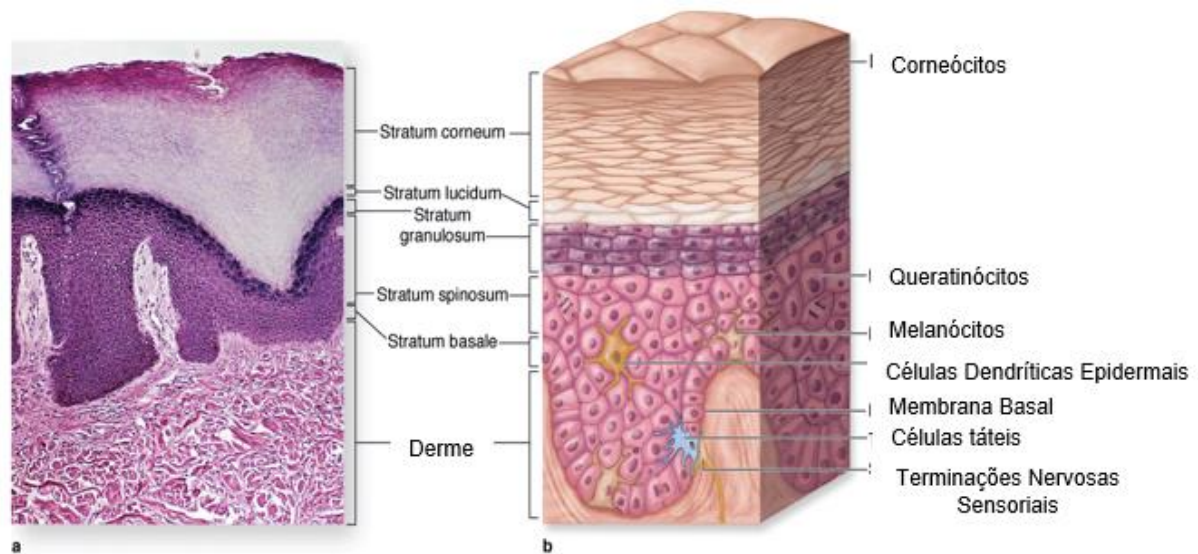
Com uma área superficial de cerca de 2 m<sup>2</sup> em um adulto de porte médio, a pele é o maior órgão dos seres humanos (HWA et al., 2011; HIRSCHBERG et al., 2015) e possui papel essencial na defesa do corpo contra agentes externos além de prevenir a perda de água, de eletrólitos e de auxiliar no controle da temperatura corporal (HWA et al., 2011). Sua espessura e presença de anexos como glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos podem variar de acordo com a região anatômica e de indivíduo para indivíduo (GABORIAU; MURAKAMI., 2001; JEPPS et al., 2013).

A pele pode ser dividida em duas camadas principais: a epiderme e a derme (Figura 1). A epiderme é a camada mais superficial deste órgão e é majoritariamente composta por queratinócitos (cerca de 80%) além de melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Esta camada da pele pode ainda ser dividida em quatro subcamadas constituídas por queratinócitos em diferentes estados de diferenciação: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* e *stratum corneum* (GABORIAU; MURAKAMI., 2001).

Logo abaixo da epiderme encontra-se a derme que abriga os vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e também apêndices cutâneos (JEPPS et al., 2013). A derme é constituída por células como os fibroblastos, células dendríticas dérmicas (DDC), mastócitos, monócitos e macrófagos e também componentes extracelulares, como colágeno e fibras elásticas (VENUS et al., 2011; BARCAUI et al., 2015).



**Figura 2 – Anatomia e camadas da epiderme.**



Source: Mescher AL; Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition; <http://www.accessmedicine.com>  
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Fonte: adaptada de Mescher (2009).

Acima do estrato espinhoso, encontra-se o estrato granuloso no qual os queratinócitos passam a sintetizar proteínas envolvidas no processo de queratinização celular (involucrina, loricrina e filagrina) que impedem o transporte de nutrientes para as células do estrato subsequente denominado estrato córneo. Desse modo, os queratinócitos dessa camada se degeneram e seu núcleo e organelas citoplasmáticas são digeridos por enzimas lisossômicas formando células achatadas e anucleadas denominadas corneócitos (VENUS et al., 2011; JEPPS et al., 2013; MONTANARI., 2016).

Os corneócitos são ricos em proteínas que estão imersas em uma matriz lipídica e compreendem uma rede de filamentos de queratina (JEPPS et al., 2013). Esta estrutura organizada e densa é a principal responsável pela eficácia da estrato córneo como barreira físico-química, tanto contra a permeação de compostos exógenos na pele, quanto para a difusão de compostos endógenos além de ser a principal barreira contra a perda de água (HIRSCHBERG et al., 2015).

Logo abaixo da epiderme encontra-se a derme (Figuras 1 e 2), que pode atingir até 5 mm de profundidade de acordo com a região anatômica (VENUS et al., 2011). A principal célula da derme é o fibroblasto que sintetiza colágeno e elastina. Também

estão presentes na derme células apresentadoras de antígenos, mastócitos e histiócitos (VENUS et al., 2011), envolvidas na resposta imunológica à agentes “estranhos” à pele.

Além de estruturas celulares, a derme abriga vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas bem como apêndices cutâneos como folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (JEPPS et al., 2013).

Os folículos pilosos são invaginações da epiderme que chegam até a região da derme ou da hipoderme e estão presentes em quase toda superfície corporal. O folículo piloso é formado pelas bainhas radiculares interna e externa e pela bainha dérmica, mais externa, localizada no bulbo piloso (VENUS et al., 2011; OVALLE; NAHIRNEY., 2014; MONTANARI., 2016). Ancorada à bainha dérmica encontram-se também as glândulas sebáceas. Estas sintetizam ácidos graxos e ésteres de cera que desembocam no folículo piloso e lubrificam tanto a pele como os pêlos (MONTANARI., 2016).

As glândulas sudoríparas também se formam através de invaginações da epiderme e estão amplamente distribuídas na superfície cutânea regulando a temperatura corporal em virtude da evaporação do suor, que promove o resfriamento da superfície cutânea (MONTANARI., 2016).

## **2.2 ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE MEDICAMENTOS**

A elevada área superficial da pele a torna uma rota potencial para veiculação de substâncias terapêuticas através da administração tópica (GOYAL et al., 2016). Como vantagens, a via tópica evita o metabolismo hepático de primeira passagem de fármacos, comum para medicamentos utilizados por via oral; apresenta efeitos colaterais reduzidos; é uma forma não invasiva e indolor de administração, se comparada com as injeções parenterais e é conveniente para o paciente já que a aplicação pode ser realizada pelo mesmo (PRIYANKA; SINGH., 2014; VITORINO et al., 2015; PHAM et al., 2016).

Apesar das vantagens, características como idade, local de aplicação, etnia, gênero, integridade, hidratação da pele e propriedades físico-químicas da substância aplicada afetam diretamente a permeação e penetração cutânea e devem ser levadas

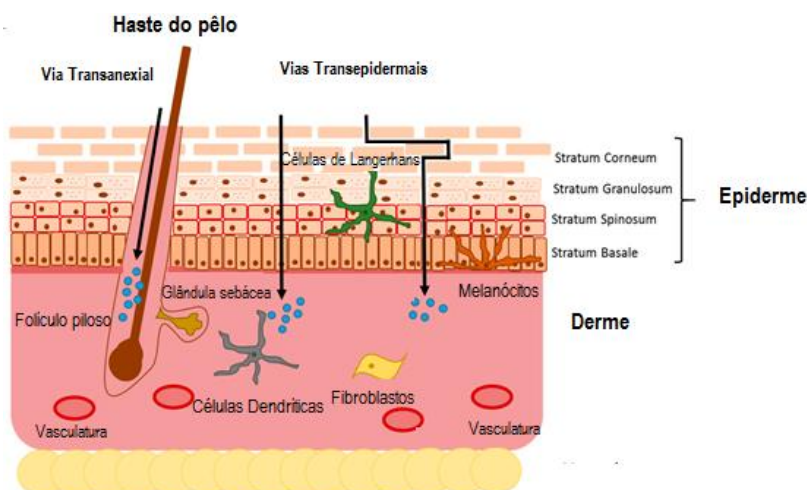
em consideração no desenvolvimento de novos produtos (CHORILLI et al., 2007; VITORINO et al., 2015).

A administração tópica pode também ter como finalidade efeitos locais ou sistêmicos (MARTINS; VEIGA., 2002). Quando o objetivo é a ação local do produto, como ocorre no caso de protetores solares, antissépticos, anti-inflamatórios e outros produtos dermatológicos, o fármaco deverá ser distribuído e manter-se principalmente na epiderme e na derme. Já quando o intuito é a obtenção de efeitos sistêmicos como no caso de adesivos transdérmicos, a substância terapêutica deverá atravessar o epitélio e atingir os vasos sanguíneos (GOYAL et al., 2016).

### 2.2.1 Vias de absorção cutânea

Existem duas rotas principais de permeação através da pele: a transepidérmica e a transaxial (CHORILLI et al., 2007), representadas na Figura 3. A via transepidérmica ocorre através do estrato córneo (EC), considerado a barreira limitante da absorção cutânea e pode ser classificada em intercelular ou transcelular (EL MAGHRABY et al., 2008; JEPPS et al., 2013; VITORINO et al., 2015).

**Figura 3** – Vias de absorção cutânea para fármacos de uso tópico.



Fonte: adaptada de Palmer e DeLouise (2016).

A via intercelular ocorre através da matriz lipídica do EC e mesmo apresentando uma área superficial disponível reduzida e de ser uma rota tortuosa, essa é a principal forma de permeação da maioria dos compostos (EL MAGHRABY et al., 2008). Já a rota intracelular, apesar de mais direta (VITORINO et al., 2015), o medica-

mento aplicado deve atravessar não só a matriz lipídica da camada córnea, mas, também, penetrar no ambiente intracelular dos corneócitos o que requer partições consecutivas entre meios hidrofílico e lipofílico (JEPPS et al., 2013). A permeação por essa via está associada às substâncias mais polares uma vez que o interior dos corneócitos possui a queratina que é relativamente hidratada (VITORINO et al., 2015).

A via transanexial ocorre através dos folículos pilosos associados às glândulas sebáceas e através de glândulas sudoríparas. Esta via e é normalmente considerada menos significativa quando comparada com a transepidermal, uma vez que os anexos cutâneos recobrem em média apenas 0,1% da superfície corporal (KILIAM et al., 2015). No entanto, esses valores podem variar dependendo do local. Os folículos pilosos, por exemplo, podem chegar a 13% da área superficial do couro cabeludo sendo, nesses casos, relevantes na entrada de moléculas polares, que dificilmente conseguiriam atravessar o estrato córneo (BOLZINGER et al., 2012; PLANZ et al., 2016).

É importante ressaltar que um determinado composto químico não utiliza necessariamente uma só via de penetração, podendo este permear através da pele por uma combinação das rotas transepidermal e transanexial, de acordo com suas características físico químicas (JEPPS et al., 2013; VITORINO et al., 2015).

## **2.3 CÂNCER DE PELE**

Neoplasias de pele apresentam basicamente duas classificações, podem ser do tipo melanoma ou não melanoma, de acordo com a célula da qual se origina a lesão tumoral (BAGDE et al., 2018). O câncer do tipo não melanoma é considerado a forma predominante de câncer no ser humano e sua incidência tem aumentado rapidamente nas últimas décadas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrem no mundo cerca de 2,5 milhões de novos casos desse tipo de tumor a cada ano, sendo que apenas no Brasil a incidência estimada em 2016 foi em torno de 180 mil casos (FACINA., 2011).

Dentre os tipos de câncer não melanoma estão o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC) (Figura 4) decorrentes de mutações de células da camada basal e do estrato espinhoso da epiderme, respectivamente. O CBC é considerado mais comum, e é caracterizado por ser de crescimento lento e por raramente apresentar metástases, enquanto o CEC é menos incidente e mais agressivo com um risco de metástases que varia de 2 a 6% (HAQUE et al., 2015; FEOKTISTOVA et al.,

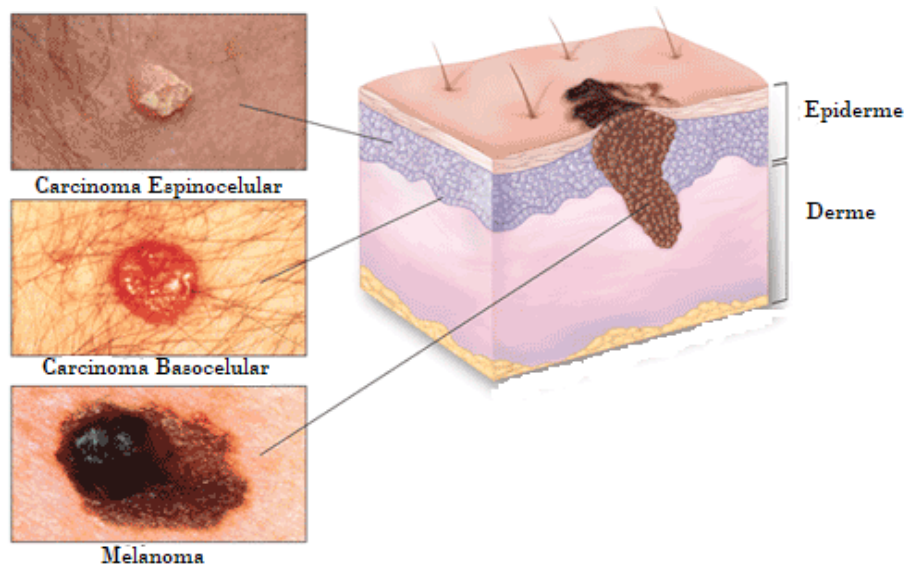
2017). Apesar da incidência estimada ser elevada, essas neoplasias apresentam baixa taxa de mortalidade o que contribui para a subnotificação desse tipo de câncer nos órgãos de registro (APALLA et al., 2017). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (Inca) considera como mínimas as estimativas anunciadas (FEOKTISTOVA et al., 2017).

Já o câncer do tipo melanoma (Figura 4) é mais raro comparado ao CBC e ao CEC e se origina dos melanócitos da camada basal da epiderme. Apesar de representar apenas 1% de todos os casos de câncer de pele, os melanomas são responsáveis por 80% das mortes decorrentes desse tipo de neoplasia (ZHENG et al., 2016; VALACHOVIC; ZUBENKO., 2017), tendo apresentado nos últimos 50 anos um aumento anual de 0,6% dos casos incidentes (APALLA et al., 2017).

O aumento da incidência tanto do câncer de pele não melanoma como do melanoma estão associados ao aumento da exposição à poluentes ambientais, agentes químicos cancerígenos, exposições ocupacionais à carcinógenos, susceptibilidade genética e principalmente à radiação ultravioleta (RUV) (FABBROCIN et al., 2010).

A exposição à RUV é o fator ambiental de maior relevância na progressão desse tipo de tumor, contribuindo para o seu desenvolvimento via geração de fotoprodutos mutagênicos no DNA, mutações em genes reguladores das funções celulares, como o p53, supressor tumoral, e radicais livres citotóxicos além de apresentar ação imunossupressora (FESTA NETO., 2002; MENEZES et al., 2016). As mutações geradas pela radiação solar também levam a falhas nos mecanismos de reparo do DNA, propiciando a progressão tumoral e o desenvolvimento de novas lesões pré-cancerosas (CHINEM; MIOT., 2011; HAQUE et al., 2015).

**Figura 4 – Tipos de câncer de pele.**



Fonte: adaptada de *National Cancer Institute* (NCI). Disponível em: <<http://visualonline.cancer.gov>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

### **2.3.1 Tratamentos tópicos para o câncer de pele**

Apesar da cirurgia e da radioterapia serem as principais modalidades para o tratamento de neoplasias cutâneas, a terapia tópica é uma alternativa promissora para determinados tipos de câncer de pele (HAQUE et al., 2015). Isso porque o tratamento cirúrgico torna-se difícil em casos de lesões múltiplas ou extensas devido à necessidade de remover o tecido lesionado com margem adequada de segurança que pode ser desfigurante levando à perda excessiva de tecido e à necessidade de enxertia. Além disso, fármacos antitumorais administrados por via oral ou endovenosa são associados a efeitos adversos severos (JANG et al., 2011; HAQUE et al., 2015).

Estratégias não cirúrgicas de tratamento têm reduzido a mortalidade e morbidade associada ao câncer de pele além de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Dentre essas estão o uso de agentes cujos alvos são receptores celulares diretamente associados ao desenvolvimento de tumores ou substâncias capazes de direcionar as respostas imunes especificamente à lesão cancerosa (SIMÕES et al., 2015). No entanto, até o momento poucas moléculas para aplicação tópica em neoplasias cutâneas estão aprovadas (HAQUE et al., 2015). Dentre os agentes quimioterápicos tópicos aprovados pelo FDA estão: 5-fluorouracil, diclofenaco, retinóides e o imiquimode (FAHRADYAN et al., 2017; SINGH et al., 2017).

O 5-fluorouracil (5-FU) está disponível na forma de creme em diferentes concentrações 0,5, 1,0 e 5% e também na forma de solução à 2 e 5%. Esse medicamento foi aprovado para terapia de lesões cancerosas como ceratose actínica (neoplasia cutânea benigna), carcinoma basocelular e doença de Bowen (um subtipo do carcinoma espinocelular). O 5-FU é um antimetabólito capaz de promover a inibição da enzima timidilato sintetase envolvida na conversão da deoxiuridina no nucleosídeo timidina. Quando inibida, essa enzima leva à redução da síntese de DNA e consequentemente à morte de células em alta atividade mitótica (SINGH et al., 2017).

O diclofenaco na forma de gel 3% em ácido hialurônico é usado para tratamento da doença de Bowen. Sua ação ocorre pela inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) levando a menor produção de ácido aracdônico que por sua vez está associado à promoção de eventos como angiogênese, inibição da apoptose e aumento do potencial invasivo tumoral (MICALI et al., 2014). Dessa forma, a inibição de COX-2 resulta na redução de queratinócitos displásicos, que apresentam proliferação anômala (SINGH et al., 2017).

Os retinóides, tretinoína, adapaleno e tazaroteno foram aprovados para tratamento de lentigo maligno (um subtipo de melanoma) e carcinoma basocelular. Esses componentes interferem na proliferação e diferenciação celular através da ligação a receptores nucleares que inibem a fase de propagação tumoral no processo de carcinogênese (SINGH et al., 2017).

Finalmente, o imiquimode (Imq) está disponível na forma de creme a 2,5, 3,75 e 5%, sendo recomendado para tratamento de carcinoma basocelular superficial. O Imq é um imunomodulador capaz de ativar a resposta imunológica tanto inata como adquirida, resultando na apoptose de células tumorais (HAQUE et al., 2015; SINGH et al., 2017).

Em estágios ainda de investigação estão outros agentes (Quadro 1) como resiquimod, piroxicam, formulações contendo dobesilato de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e ácido betulínico que parecem apresentar eficácia contra o câncer de pele (FAHRADYAN et al., 2017).

**Quadro 1** – Medicamentos tópicos emergentes no tratamento do câncer de pele

| <b>Fármaco</b>   | <b>Indicações em investigação</b>         | <b>Mecanismos de ação</b>                                 |
|------------------|---|---|
| Resiquimod       | Ceratose actínica                         | Imunomodulador  |
| Piroxicam        | Ceratose actínica                         | Inibição da ciclooxigenase levando ao aumento da apoptose |
| Dobesilato       | Ceratose actínica e carcinoma basocelular | Inibição de fatores de crescimento de fibroblastos        |
| Ácido betulinico | Ceratose actínica                         | Efeito citotóxico, apoptótico e antiproliferativo         |

Fonte: adaptado de Singh et al. (2017).

A escolha do tratamento é baseada no tipo, tamanho, localização da lesão e idade do paciente (HAQUE et al., 2015). É importante ressaltar que a terapia tópica é considerada quando os tumores estão presentes nas camadas mais superficiais da pele e quando métodos cirúrgicos não são indicados, como no caso de lesões múltiplas e com limites indefinidos, pacientes imunossuprimidos ou com histórico de cicatrizes hipertróficas ou quelóides (HAQUE et al., 2015; SIMÕES et al., 2015).

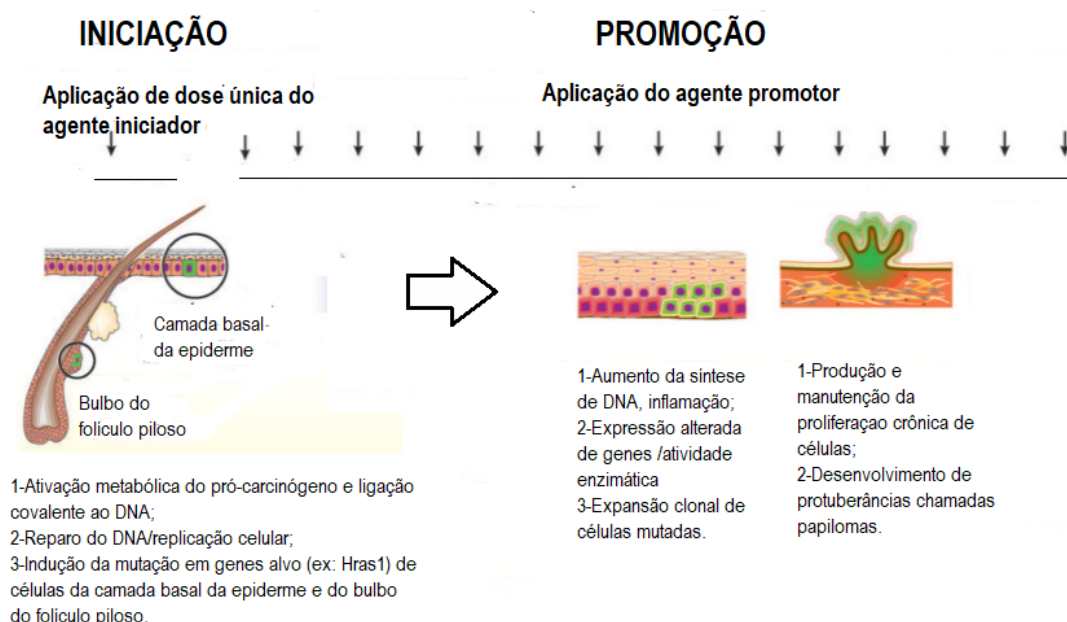
## **2.4 MODELO DE CARCINOGENESE QUÍMICA MULTIETAPAS EM PELE DE CAMUNDONGO**

Modelos bem estabelecidos de carcinogênese química em pele de roedores têm sido amplamente utilizados para melhora da compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão de neoplasias epiteliais (ABEL et al., 2009) bem como na avaliação quimiopreventiva de diferentes compostos (SAINI et al., 2010; JAIN et al., 2015; AL ASMARI; KHAN., 2016). Entende-se como quimioprevenção a ação profilática de substâncias naturais ou sintéticas capazes de reverter ou atrasar a evolução de lesões tumorais pré-cancerosas (SHARMA et al., 2016; SHAN et al., 2016).

Em modelos tumorais murinos envolvendo duas etapas, o primeiro estágio da carcinogênese química é denominado “iniciação”. Nessa fase, genes de queratinócitos epidérmicos, principalmente da camada basocelular e da epiderme interfolicular, adquirem mutações como resultado à aplicação tópica de dose única de um agente iniciador, sendo DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antraceno) o mais comumente utilizado (ABEL et al., 2009). O DMBA é convertido metabolicamente em carcinógenos que se ligam covalente e irreversivelmente ao DNA levando a mutações nos genes Hras1 e Kras (SAINI et al., 2010), diretamente associados ao desenvolvimento de câncer de pele do tipo não melanoma (CAULIN et al., 2007).

Após a iniciação, é seguida a etapa de promoção na qual as células mutadas irão sofrer expansão clonal. Essa etapa ocorre por meio da aplicação repetida de agentes promotores, como ésteres de forbol presente no óleo de cróton, que levam ao desenvolvimento de tumores através do estímulo a sinalização celular e ao aumento da produção de fatores de crescimento resultando em hiperplasia epidermal. Durante esse processo, as células que foram mutadas parecem ter vantagens sobre as células vizinhas permitindo sua expansão seletiva resultando no desenvolvimento de lesões cutâneas pré-malignas também chamadas de papilomas (ABEL et al., 2009) (Figura 5).

**Figura 5** – Modelo de carcinogênese química em camundongos realizado em duas etapas.



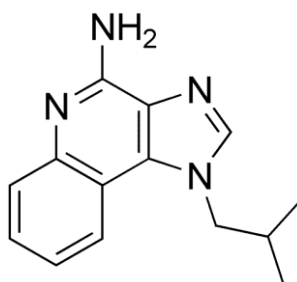
Fonte: adaptada de Abel et al. (2009).

O modelo de carcinogênese química em duas etapas apresenta também semelhanças com os cânceres humanos em nível genético e molecular como mutações na família do oncogene ras envolvido na atividade celular mitótica, ativação de fatores de crescimento além de mimetizar a exposição constante à múltiplas subdoses de carcinógenos e agentes promotores ao longo da vida (DE GRUIJL et al., 2001; ABEL et al., 2009). Em virtude da similaridade desse modelo com o desenvolvimento de tumores cutâneos em humanos (YANG et al., 2014), possíveis inibidores tumorais podem ser avaliados quanto aos seus efeitos nas etapas de iniciação, promoção e progressão dos tumores formados (ABEL et al., 2009).

## 2.5 IMIQUIMODE

O Imq, um composto sintético e análogo de nucleosídeo (SCHÖN; SCHÖN., 2007; HWANG et al., 2014), é uma imidazoquinolina imunomoduladora com elevada atividade antiviral e antitumoral sendo também conhecido como S-26308 e R-837 (KANG et al., 2006) (Figura 6). Este composto foi o primeiro de uma nova classe de imunomoduladores para uso tópico (MICALI et al., 2014) e começou a chamar a atenção no final de 1980, quando alguns relatos demonstraram seu potencial terapêutico e profilático em modelos animais para infecções por citomegalovírus (CMV) e o herpes simplex tipo 2 (VACCHELLI et al., 2012). Com uma massa molar de 240,3 g/mol (SCHÖN; SCHÖN., 2007), o Imq apresenta baixa solubilidade em meio aquoso (0,60 µg/mL) e também é pouco solúvel em solventes orgânicos (Quadro 2) (CHOLLET et al., 1999). No entanto, em pH ácido, pode tornar-se mais solúvel uma vez que o composto é considerado uma base fraca, com um pKa de 7,3 (TELÒ et al., 2016).

**Figura 6** – Estrutura química do imiquimode.



Fonte: Gerster et al. (2005).

**Quadro 2** – Solubilidade do imiquimode em diferentes solventes

| Solvente        | Solubilidade (mg/mL) |
|-----------------|----------------------|
| Acetona         | 0,12                 |
| Etanol          | 0,24                 |
| Metanol         | 0,46                 |
| Propilenoglicol | 0,12                 |

Fonte: adaptada de Chollet et al. (1999).

Em 1997, o Imq creme 5% (p/p) cuja composição está descrita no Quadro 3, foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso tópico no tratamento de condilomatose genital externa (MACEDO et al., 2007; MICALI et al., 2014) e, em 2004, o FDA liberou seu uso tópico também para o tratamento do carcinoma basocelular

(CBC) superficial (MACEDO et al., 2007). No Brasil, o Imq creme 5% foi liberado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2006 para uso em pacientes maiores de 12 anos sendo recomendado apenas para aplicação externa.

**Quadro 3 – Composição imiquimode creme**

| Componentes  | Quantidade (mg) |
|--------------|-----------------|
| Imiquimode   | 50              |
| Excipientes* | 1000            |

\*álcool cetílico, álcool estearílico, petrolato líquido, polissorbato 60, estearato de sorbitana, glicerol, goma xantana, metilparabeno, propilparabeno, álcool benzílico, ácido isoesteárico, água purificada.

Fonte: disponível em: <[www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula)>.

Estudos clínicos já realizados e em andamento demonstram também o potencial do Imq, associado ou não a outras substâncias ou procedimentos no tratamento de outras lesões cutâneas, como lentigo maligno, neoplasias intraepilêliais, hemangiomas e metástases cutâneas de câncer de mama dentre outras (Quadro 4).

**Quadro 4– Estudos clínicos de produtos contendo o imiquimode ou associações para tratamento de lesões cutâneas**

| Condição Tratada                              | Tratamento  | Resultados  | Número NCT         | Publicações           |
|---|---|---|--------------------|-----------------------|
| <i>Alopecia aerata</i>                        | Imq   | Não disponíveis   | NCT00177021        | Não publicados        |
|   | Imq   | Não disponíveis   | NCT00176943        | Não publicados        |
| Câncer de mama/metástases recorrentes na pele | Imq   | Regressão histológica do tumor e evidência de resposta antitumoral imunológica mediada pelo Imq | NCT00899574+E9:E20 | Adams et al. (2012)   |
|   | Imq +Nab-paclitaxel (albumina ligada ao Paclitaxel) | Indução efetiva da regressão de metástases cutâneas do câncer de mama                           | NCT00821964        | Salazar et al. (2017) |
|   | Imq+Radiação+Ciclofosfamida                         | Não disponíveis   | NCT01421017        | Não disponível        |
| Doença de Paget                               | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína                | Não disponíveis   | NCT02385188        | Não publicados        |
|   | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína                | Não disponíveis   | NCT00504023        | Não publicados        |
| Hemangioma                                    | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína                | Melhora na coloração, mas nenhum efeito no tamanho da lesão                                     | NCT00601016        | McCuaig et al. (2009) |
| Leishmaniose cutânea                          | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína                | Não disponíveis   | NCT01380314        | Não publicados        |
|   | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína                | Não disponíveis   | NCT00257530        | Não publicados        |

**Quadro 4, cont.**

| Condição Tratada   | Tratamento                           | Resultados   | Número NCT  | Publicações            |
|--|--------------------------------------|--|-------------|------------------------|
| Lentigo maligno  | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína | O pré-tratamento com Imq pode reduzir a extensão cirúrgica. Não ocorreram melhoras estatisticamente significativas no tratamento com a inclusão do tazaroteno (retinoide tópico) | NCT00707174 | Hyde et al. (2012)     |
| Linfoma cutâneo  | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína | Não disponíveis  | NCT02301494 | Não publicados         |
| Mancha de vinho do porto                                     | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína | Associação do Imq com o tratamento de Laser pulsado levou a redução do eritema e melhoria da coloração da pele   | NCT00585247 | Tremaine et al. (2012) |
| Neoplasia cervical Intraepitelial                            | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína | Remissão e regressão histológica das lesões pé-tumorais superior ao grupo placebo  | NCT00941252 | GRIMM et al. (2012)    |
| Neoplasia intraepitelial anal/ Lesão intraepitelial escamosa | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína | Não disponíveis  | NCT02059499 | Não publicados         |
| Neoplasia intraepitelial vulvar                              | Imq tópico + Paracetamol + Lidocaína | Não disponíveis  | NCT01861535 | Não publicados         |

Fonte: disponível em: <www.ClinicalTrials.gov>.

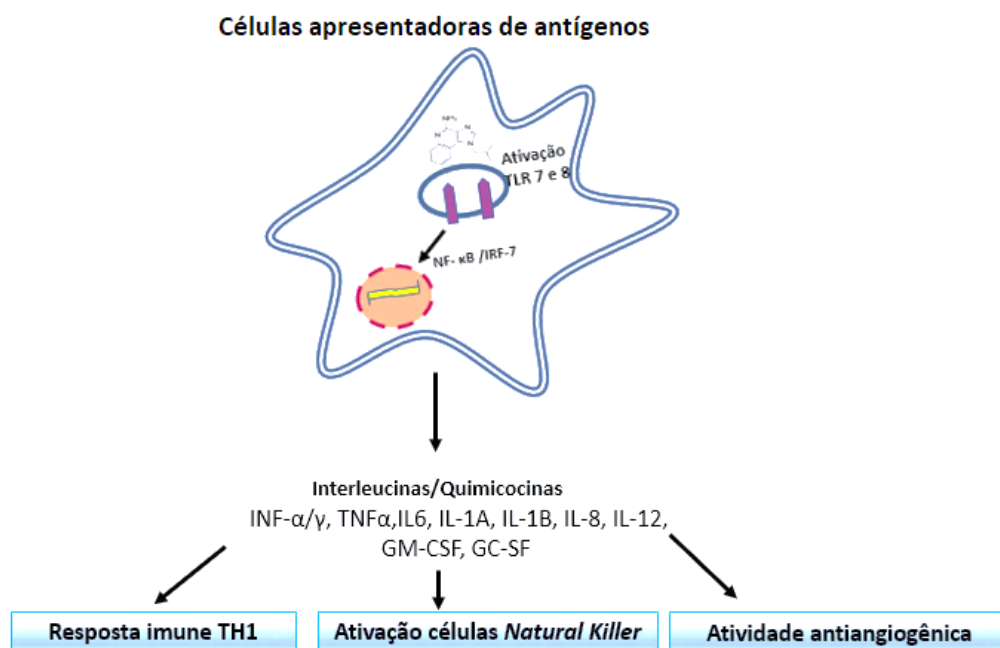
## 2.5.1 Mecanismos de ação

### 2.5.1.1 Ação agonista à receptores *Toll like*

Os receptores *Toll like* (TLRs) são glicoproteínas transmembranas presentes em células apresentadoras de antígenos como macrófagos, monócitos, células de Langerhans e células dendríticas (MICALI et al., 2014). Esses receptores podem ocorrer tanto na membrana plasmática dessas células como em seus compartimentos endossomais (SCHÖN; SCHÖN., 2007).

Os TLRs 7 e 8 são receptores endossomais e têm como ligantes naturais RNAs de fita simples (SCHÖN; SCHÖN., 2007), sendo também ativados pela molécula de Imq (KAWAI; AKIRA., 2010). A ativação dos TLRs por seus ligantes irá levar a ativação e translocação nuclear de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e IRF-7 (Figura 7).

**Figura 7** – Mecanismos de ação do imiquimode em receptores TLR.



Fonte: dados da pesquisa.

A ativação dos fatores de transcrição irá promover a expressão de genes associados às reações inflamatórias como de citocinas e quimioquinas INF- $\alpha/\gamma$ , TNF $\alpha$  (BIFFEN et al., 2012; MICALI et al., 2014), de interleucinas (IL) 6,1A,1B,8, 12, GM-CSF, GC-SF, à regulação de sinais coestimulatórios de células apresentadoras de antígenos, à diferenciação e maturação de células dendríticas (HEDAYAT et al., 2011) e à ativação de células NK (*Natural Killers*) (YOO et al., 2013). Estes efeitos atuam no direcionamento da resposta imune para o tipo TH1 uma vez que promove a migração de células de Langerhans da pele para os gânglios linfáticos, aumentando assim a apresentação de antígenos às células T (SCHON; SCHON., 2007; BIFFEN et al., 2012). Esse mecanismo irá então mediar a resposta imune contra tumores sendo provavelmente o responsável pelas propriedades antitumorais do Imq (MACEDO et al., 2007; SCHÖN; SCHÖN., 2007).

Dentre as citocinas que têm sua produção aumentada em consequência da ativação de receptores TLR está a IL-12 que atua na redução da produção celular de fatores proangiogênicos, como bFGF e VEGF, inibe a motilidade e invasão vascular e induz a apoptose de células endoteliais (LI et al., 2005; KUZNETSOVA et al., 2012). Estas propriedades anti-angiogênicas estão associadas à inibição do crescimento patológico de novos vasos (MAJEWSKI et al., 2005; KUZNETSOVA et al., 2012), comum em carcinomas basocelulares (CROWSON., 2006).

### 2.5.1.2 Ação pró-apoptótica

A apoptose é a morte celular programada caracterizada pela fragmentação de DNA e formação de corpos apoptóticos culminando na eliminação de células não viáveis (HUANG et al., 2010). As duas principais vias apoptóticas são: a via mediada por receptores de morte celular (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca) (HUANG et al., 2010).

Apesar do papel do Imq na apoptose ainda não estar completamente elucidado (SCHÖN; SCHÖN., 2007), alguns estudos *in vivo* e *in vitro*, sugerem possíveis vias de ação do fármaco nesse processo.

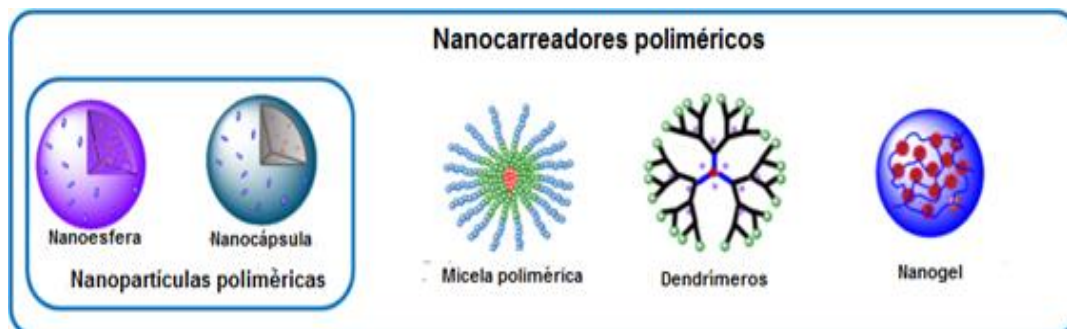
O uso do Imq creme em pacientes com lesão de CBC já diagnosticada levou ao aumento da expressão do receptor de morte celular CD95 (Fas) relacionados à via apoptótica extrínseca (SCHÖN; SCHÖN., 2007). Em outro estudo *in vivo* foi observada, durante terapia com Imq, a diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (célula B de linfoma-2) reguladora da permeabilidade mitocondrial, associada à via apoptótica intrínseca (VIDAL et al., 2004). Esses resultados sugerem que o Imq aumentaria a suscetibilidade de células tumorais aos estímulos apoptóticos (SCHÖN; SCHÖN., 2007).

Em experimentos utilizando linhagens celulares de melanomas, o bloqueio dos receptores de morte celular não afetou a capacidade pró-apoptótica do Imq, o que ocorreu quando foi realizada a inibição de caspases (proteínas proteolíticas) principalmente da caspase 9, dependente da liberação de citocromo C pela mitocôndria, via Bcl-2. Este resultado sugere atuação do Imq através da via intrínseca de caspases independentemente dos receptores de morte celular de membrana (SCHÖN; SCHÖN., 2004; MACEDO et al., 2007).

## 2.6 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas são sistemas de tamanho submicrométricos (tamanho inferior a 1.000 nm), nos quais a substância carregada pode estar tanto adsorvida à superfície do nanocarreador como em seu interior (SHARMA et al., 2016). Dentre os carreadores poliméricos utilizados na liberação de fármacos estão as micelas poliméricas, nanogéis, dendrímeros e nanopartículas poliméricas (WU et al., 2011) (Figura 8).

**Figura 8 – Nanocarreadores poliméricos.**



Fonte: adaptada Conriot et al. (2014).

As micelas poliméricas são estruturas entre 10 e 100 nm, formadas por uma camada hidrofílica ao redor de um núcleo hidrofóbico e são obtidas após a auto-organização de copolímeros anfifílicos em bloco. A formação dessas micelas irá depender da concentração polimérica e da temperatura utilizada no processo de preparo. O domínio hidrofóbico do núcleo é responsável pelo *payload* da substância carregada enquanto a membrana ao seu redor apresenta as estruturas hidrofílicas responsáveis pelo aumento da solubilidade aparente do composto em água além de contribuir para a estabilidade estérica das micelas (KOWALCZUK et al., 2014; NAZIR et al., 2014). Esses sistemas são normalmente estudados para utilização em injetáveis, uma vez que seu diâmetro reduzido favorece o não reconhecimento dessas estruturas pelo sistema fagocitário mononuclear (KOWALCZUK et al., 2014).

Nanogéis poliméricos (tamanho inferior à 200 nm) são constituídos por cadeias poliméricas reticuladas por processos físicos ou químicos de modo a formar uma rede tridimensional em escala nanométrica (KOWALCZUK et al., 2014; MAVUSO et al., 2015). A essas redes podem ser incorporados fármacos formando, dessa forma, sistemas de liberação controlada ou sustentada que podem também variar seu tamanho (através de intumescimento e desagregação da matriz polimérica), de acordo com o pH do meio circundante, o tipo de solvente em contato com o gel e a temperatura (MAVUSO et al., 2015).

Já o termo “nanopartícula polimérica” inclui tanto nanocápsulas como nanoesferas. As nanocápsulas são formadas por um núcleo oleoso envolto por uma membrana polimérica (SCHAFFAZICK et al., 2013) e, nesse tipo de dispersão coloidal, o fármaco pode estar tanto dissolvido na cavidade oleosa como adsorvido ao polímero. Já

as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição, sendo sistemas homogêneos nos quais o fármaco é disperso no interior da matriz polimérica (VRIGNAUD et al., 2011; SEREMETA et al., 2013).

As principais vantagens das nanopartículas sobre partículas de maior tamanho são a elevada relação área/volume, maior reatividade, possibilidade de encapsular fármacos pouco solúveis, possibilidade de proteger moléculas terapêuticas (VRIGNAUD et al., 2011; BERTRAND et al., 2014), modular propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de determinados fármacos e minimizar/eliminar efeitos colaterais associados ao uso destes, oferecendo maior adesão do paciente ao tratamento proposto (OURIQUE et al., 2011).

### **2.6.1 Nanopartículas poliméricas para uso tópico**

A estrutura multicamadas da pele bem como sua função de barreira protetora contra patógenos, microorganismos e substâncias tóxicas torna a administração de fármacos pela via tópica um grande desafio (ZHENG et al., 2013).

Por esta razão a veiculação de compostos terapêuticos por meio de nanopartículas por essa rota têm atraído bastante atenção na última década (ZHANG et al., 2013). Os nanocarreadores podem facilitar a entrega de fármacos através dos folículos pilosos e através da interação com a matriz lipídica da pele favorecendo rotas de transporte da substância carregada que não ocorreriam com o princípio ativo em sua forma livre (em solução). Além disso, a aplicação tópica dessas dispersões pode promover a formação de depósitos da substância carregada em compartimentos ou camadas específicas da pele obtendo assim uma liberação sustentada ou induzida por estímulo (pH, temperatura) (VOGT et al., 2016).

O desenvolvimento e a aplicação de nanopartículas poliméricas, foco desse trabalho, têm sido extensivamente explorados e avaliados em estudos pré-clínicos no tratamento de diversas condições patológicas que acometem a pele com resultados promissores (Quadro 5).

**Quadro 5 – Estudos utilizando nanopartículas para uso tópico.**

| <b>Polímero</b>                              | <b>Substância Carreada</b>   | <b>Ação Pretendida</b>            | <b>Resultados</b>  | <b>Referências</b>       |
|--|------------------------------|-----------------------------------|--|--------------------------|
| PLGA   | Bromelaína                   | Antitumoral                       | Atividade antitumoral superior à forma livre da enzima   | Bhatnagar et al., (2015) |
| PLGA   | Retinil Palmitato            | Anti-idade                        | Permeação do ativo em camadas profundas da pele.   | Teixeira et al. (2010)   |
| PLGA   | Porfirina                    | Antimicrobiana                    | Permeação do ativo através do estrato córneo e retenção nas camadas superficiais do epitélio, desejável para associação à terapia fotodinâmica | Gonzalez et al. (2016)   |
| PLGA/<br>quitosana/<br>ácido oleico          | Espantide e cetoprofeno      | Anti-inflamatória                 | Translocação dos ativos até camadas mais profundas da pele   | Shah et al. (2012)       |
| Quitosana                                    | Hidrocortisona/Hidroxitiroso | Anti-inflamatória e anti-oxidante | Retenção do ativo na derme e epiderme  | Hussain et al. (2012)    |
| eudragit®<br>EPO<br>(polimetacrilato)        | Adapaleno                    | Tratamento de acne                | Liberação do ativo de forma pH dependente e baixo potencial irritante das partículas desenvolvidas   | Guo et al. (2014)        |
| eudragit®<br>L100/S100<br>(Polimetacrilatos) | Dexametasona                 | Anti-inflamatória                 | Liberação do ativo pH dependente, mistura de polímeros pode modular as propriedades da nanopartículas.   | Sahle et al. (2016)      |
| PCL  | Roxitromicina                | Alopecia androgenética            | Direcionamento da liberação do ativo em glândulas pilosebáceas.  | Glówca et al. (2014)     |

Fonte: dados da pesquisa.

Nanopartículas de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo bromelaína, enzima proteolítica proveniente do abacaxi, apresentaram atividade antitumoral em modelo de carcinogênese química cutânea superior à ação da enzima livre. Essa atividade foi associada ao aumento da biodisponibilidade do ativo devido à sua liberação sustentada e contínua, quando veiculado através de nanocarreadores (BHATNAGAR et al., 2015).

Em estudo realizado por Gonzalez-Delgado et al. (2016), nanopartículas de PLGA contendo porfirina apresentaram liberação mais lenta comparada a sua forma livre, a permeação do ativo não ficou restrita ao estrato córneo, a porfirina apresentou fotoestabilidade e não ocorreram lesões teciduais causadas pelos sistemas nanométricos. Esse resultado foi atribuído a elevada eficiência de encapsulação do antimicrobiano que permitiu sua proteção contra degradação pela luz e difusão mais lenta do ativo e ao tamanho reduzido dos nanocarreadores, considerados requisitos para penetração de sistemas coloidais nas camadas superficiais da pele.

Em outro trabalho utilizando nanopartículas de quitosana contendo hidrocortisona e hidroxitirosol observou-se que a retenção desses fármacos na epiderme quando veiculados por esses sistemas foi superior ao acúmulo obtido pela forma comercial. Foi relatado também que a administração desses nanocarreadores resultou em maior controle sobre a perda de água epitelial e presença de eritemas durante estudo *in vivo*. Os autores atribuíram esses dados às propriedades oclusivas e mucoadesivas dessas nanopartículas que promoveram redução da desidratação da pele além da liberação localizada e controlada dos fármacos coencapsulados (HUSSAIN et al., 2013).

A encapsulação da dexametasona em nanopartículas de eudragit® L100 permitiu uma liberação pH-dependente do ativo o que foi associado às características físico-química do polímero (SAHLE et al., 2016).

A veiculação do antimicrobiano roxitromicina em nanocarreadores de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) levaram a permeação seletiva do ativo nos folículos pilosos o que, segundo os autores, ocorreu devido ao diâmetro das partículas bem como as características físico-químicas do polímero (GLOWCA et al., 2014).

Os resultados dos estudos citados sugerem ampla aplicação de nanopartículas por via tópica como o direcionamento do fármaco ao alvo terapêutico, liberação controlada e sustentada dos ativos, retenção dos componentes carregados em camadas específicas da pele e redução da toxicidade associada ao uso dos fármacos em sua forma livre. Dessa forma, é possível proporcionar maior eficácia do tratamento pela via tópica, redução da dose e frequência de administração do agente terapêutico e maior conforto do paciente.

### **2.6.2 Polímeros utilizados em nanocarreadores para uso tópico**

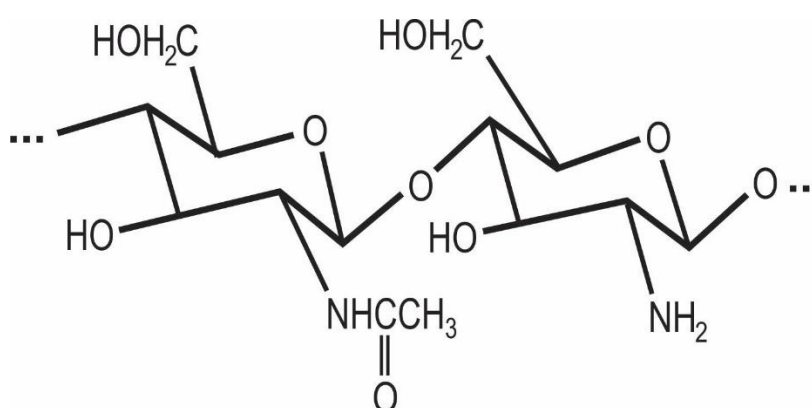
Os nanocarreadores poliméricos podem ser fabricados a base de polímeros naturais (Figura 9) ou sintéticos (Figuras 10, 11 e 12). As nanopartículas poliméricas biodegradáveis são compostas por polímeros que ocorrem na natureza, como quitosana, alginato, gelatina e albumina. Estes polímeros naturais são geralmente obtidos a partir de sua extração seguida de várias etapas de purificação (ZHANG et al., 2013).

Os polímeros sintéticos (Figuras 10, 11 e 12) também são utilizados para produção de nanopartículas e aplicação por via tópica principalmente devido ao seu alto grau de pureza e da reprodutibilidade entre diferentes lotes. Dentre os mais utilizados para aplicações tópica de fármacos estão poli(ácido lactico-co-glicólico) (PLGA), poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(metilmetacrilatos) e poli(acrilatos) (ZHANG et al., 2013).

#### 2.6.2.1 Quitosana

Dentre as partículas de polímeros naturais utilizadas, carreadores à base de quitosana (Figura 9) são os mais empregados. A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, constituinte estrutural do exoesqueleto de crustáceos. Os grupos amino desse polímero tornam-se protonados em meios moderadamente ácidos, fazendo com que sejam solúveis em água, além de tornarem-se bioadesivos, uma vez que sua carga positiva permite interações eletrostáticas com as superfícies celulares negativas (GOYAL et al., 2016).

**Figura 9** – Fórmula estrutural da quitosana.



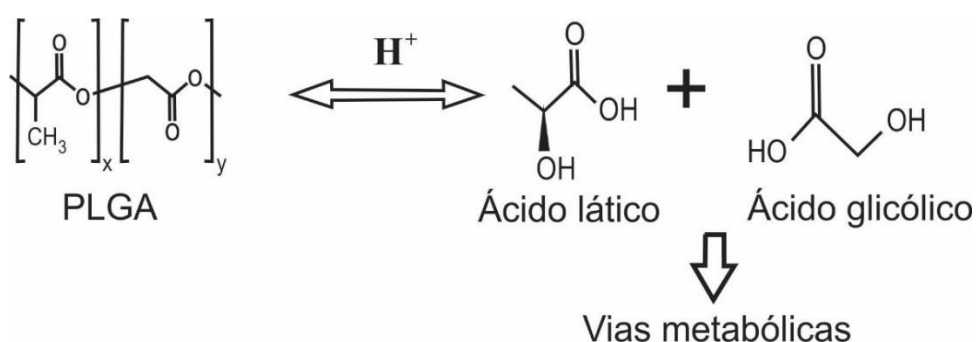
Fonte: Laranjeira et al. (2009).

Na aplicação cutânea essa interação leva à redução do potencial da membrana celular e também à diminuição da resistência da pele, propriedade importante capaz de promover melhora da permeação de fármacos por essa via. Além disso, a quitosana altera a estrutura secundária da queratina promovendo maior hidratação e fluidez do estrato córneo (YANG et al., 2014), principal barreira limitante na penetração de moléculas terapêuticas na pele (ZHANG et al., 2013).

### 2.6.2.2 Ácido poli lático-co-glicólico (PLGA)

O PLGA (Figura 10) é um polímero biodegradável aprovado pelo FDA como excipiente para administração parenteral (CHEREDDY et al., 2016). A hidrólise desse polímero no organismo leva à formação de monômeros de metabólitos biodegradáveis como o ácido lático e o ácido glicólico (KUMARI et al., 2010). Esses dois monômeros são bioprodutos de diversas vias metabólicas fisiológicas o que leva à uma toxicidade sistêmica mínima associada ao uso de PLGA para administração de medicamentos ou aplicações de biomateriais (LÜ et al., 2009; KUMARI et al., 2010).

**Figura 10** – Fórmula estrutural e produtos da hidrólise do PLGA.

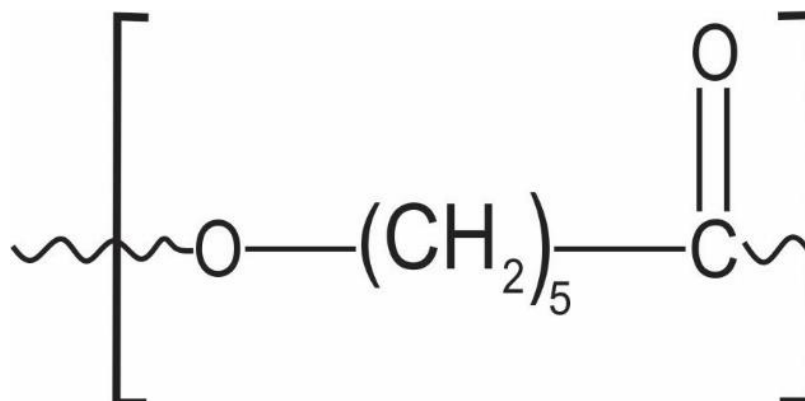


Fonte: adaptada de Kumari et al. (2010).

### 2.6.2.3 Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)

A poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) (Figura 11) é um polímero degradado através da hidrólise de suas ligações éster em condições fisiológicas e recebeu uma grande atenção para uso na administração de fármacos. É particularmente interessante também para a preparação de dispositivos implantáveis de longo prazo, devido degração mais lenta que os polactídeos (KUMARI et al., 2010).

**Figura 11** – Fórmula estrutural do PCL.

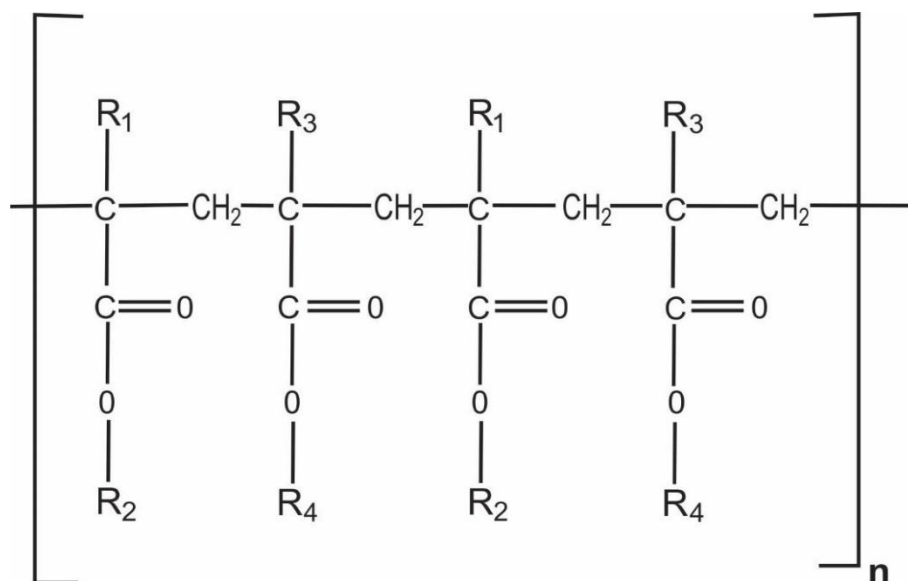


Fonte: adaptada de Kumari et al. (2010).

### 2.6.2.4 Polimetacrilatos

Os polimetacrilatos são polímeros sintéticos derivados do ácido metacrílico como metacrilato de metila, acrilato de etila, metacrilato de butila, cloridrato de trimetilamôniometacrilato ou dimetilaminometacrilato de etila (Figura 12) (VILLANOVA et al., 2010).

**Figura 12** – Fórmula estrutural da polimetacrilatos.



Para eudragit E: R1, R3=CH<sub>3</sub>, R2=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R4=CH<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, para eudragit L e eudragit S: R1, R3=CH<sub>3</sub>, R2=H, R4=CH<sub>3</sub> Para eudragit FS: R1=H, R2=H, CH<sub>3</sub>, R3=CH<sub>3</sub>, R4=CH<sub>3</sub> Para eudragit RL e eudragit RS: R1=H, CH<sub>3</sub>, R2=CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R3=CH<sub>3</sub>, R4=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> Para eudragit NE 30 D e eudragit NE 40 D: R1, R3=H, CH<sub>3</sub>, R2, R4=CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> Para Acryl-EZE and Acryl-EZE MP; eudragit L 30 D-55 e eudragit L 100-55, Eastacryl 30 D, Kollicoat MAE 30D, e Kollicoat MAE 30 DP: R1, R3=H, CH<sub>3</sub>, R2=H, R4=CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

Fonte: Patra et al. (2017).

Comercialmente são conhecidos como Acryl-EZE, Acryl-EZE MP, Eastacryl 30D; eudragit<sup>®</sup>; Kollicoat MAE 30 D; Kollicoat MAE 30 DP e metacrilatos poliméricos, podendo ser obtidos na forma de pó seco, dispersão aquosa ou solução orgânica. Podem ser catiônicos ou aniônicos de acordo com o grupo substituinte e estão incluídos no Guia de Ingredientes Inativos do FDA (cápsulas e comprimidos orais), medicamentos não parenterais licenciados no Reino Unido e lista canadense de ingredientes não medicinais aceitáveis (PATRA et al., 2017).

Dados consultados recentemente sobre patentes publicadas de formulações à base eudragit<sup>®</sup> revelaram aplicações diversificadas dos polimetacrilatos, incluindo

melhora da biodisponibilidade e liberação prolongada de substâncias terapêuticas.  
(PATRA et al., 2017).

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar a atividade antitumoral de nanopartículas contendo imiquimode comparativamente à formulação comercial do fármaco em modelo murino de câncer de pele.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para quantificação do Imq nas dispersões coloidais desenvolvidas.

2. Desenvolver formulações de nanocápsulas poliméricas contendo Imq revestidas e não revestidas com quitosana.

3. Caracterizar as formulações de nanocápsulas por meio de análises de morfologia, tamanho, potencial zeta, pH, eficiência de encapsulação, espalhamento múltiplo de luz, quantidade de solvente residual, difração de raios X, análises térmicas, espectroscopia na região do infravermelho e liberação *in vitro*.

4. Avaliar atividade antiangiogênica das formulações desenvolvidas em comparação com formulação comercial do Imq em modelo de membrana corioalantoica (CAM) de embrião de galinha.

5. Avaliar a permeação cutânea das formulações desenvolvidas em comparação com formulação comercial do imiquimode.

6. Avaliar a atividade quimiopreventiva das formulações desenvolvidas em comparação com o Imq comercial em modelo murino de câncer de pele.

## **4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DO IMIQUIMODE**

### **4.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1.1 Material**

Imiquimode (Glenmark Generic LTD, Índia), copolímero de polimetacrilato, massa molecular 125.000 g/mol (eudragit® L100, Evonik, Brasil), polímero poli-ε-caprolactona, massa molecular 14.000 g/mol (Sigma Aldrich, Brasil), quitosana de baixa massa molecular 50.000-190.000 g/mol (Sigma Aldrich, Brasil), miristato de isopropila (Sigma Aldrich, Brasil), triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (Polytechno, Brasil), triolato de sorbitano (Span® 85, Sigma Aldrich, Brasil), copolímero de polioxi-etileno-polioxipropileno (Poloxamer 407, BASF, Alemanha), polissorbato 80 (Merck, Alemanha), acetona e metanol grau CLAE, dispositivo de filtração 30 KDa (Millipore, França), coluna C18 (Phenomenex, EUA). Todos os outros solventes utilizados foram grau analítico.

#### **4.1.2 Equipamentos**

Sistema de purificação de água RiOs® (Millipore, EUA), balança analítica (Sartorius, Alemanha), agitador magnético (Nova ética, Brasil), capela de exaustão (Nalgon, Brasil), pHmetro (Digimend, Brasil), Zetasizer nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra), banho de ultrassom (Elma, Alemanha), cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent, EUA).

#### **4.1.3 Métodos**

Para validação do método analítico de quantificação do Imq em nanocápsulas, foi utilizado como referência o método descrito pela Farmacopeia Americana (USP, 2009). No entanto, este método refere-se apenas ao insumo. A metodologia proposta (Quadro 6) foi validada para uso na forma farmacêutica nanocápsula.

Foram determinados os parâmetros de Seletividade, Linearidade, Exatidão, Precisão, e estabilidade das soluções.

**Quadro 6** – Parâmetros cromatográficos USP *versus* método proposto para quantificação do imiquimode

| Parâmetro         | Farmacopeia  | Método Proposto  |
|-------------------|--|--|
| Coluna            | C18 (25 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 5 µm)            | C18 (25 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 5 µm)            |
| Fase móvel        | A = acetonitrila<br>B = tampão octanossulfonato de sódio 0,005M, pH 2, (A:B) = (27:73) | A = acetonitrila<br>B = tampão octanossulfonato de sódio 0,005M, pH 2, (A:B) = (45:55) |
| Temperatura       | 25°C   | 25°C   |
| Fluxo             | 1,5 mL/min   | 1 mL/min   |
| Volume de injeção | 20 µL  | 5 µL   |
| Detector          | UV 226 nm  | UV 226 nm  |

Fonte: dados da pesquisa.

#### 4.1.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada por meio da comparação das seguintes amostras: padrão de trabalho na concentração 25,0 µg/mL, fase móvel, diluente (acetonitrila), placebo puro revestido com quitosana e placebo fortificado. A formulação placebo foi analisada utilizando-se todos os componentes nas mesmas concentrações utilizadas nas dispersões .

Para o método ser considerado seletivo, não devem ocorrer sinais analíticos significativos dos demais componentes no mesmo tempo de retenção do Imq.

#### 4.1.3.2 Linearidade

Foi obtida uma curva de calibração pela análise de sete soluções do padrão de trabalho nas concentrações de 5, 10, 20, 25, 30, 35 e 40 µg/mL. Para cada concentração, três replicatas independentes foram preparadas. Os parâmetros da regressão foram analisados pelo método dos mínimos quadrados (MMQ).

Para o método ser considerado linear as curvas de calibração obtidas foram avaliadas conforme os testes de premissas, a seguir:

- a homocedasticidade dos resíduos foi considerada para valor  $C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$ , pelo teste de Cochran ( $\alpha = 0,05$ ); e

- no teste do resíduo padronizado de Jackknife ( $\alpha = 0,05$ ), foi permitido excluir no máximo 22,2% dos dados originais da curva de linearidade, considerados como *outliers*.

Para avaliação da adequação ao modelo linear foi realizado o teste estatístico de desvio de linearidade (F-ANOVA) no qual, o  $F_{\text{calculado}}$  deve ser menor ou igual ao  $F_{\text{crítico}}$ . Foram também calculados o coeficiente de correlação de Pearson,  $r$ , e o coeficiente de determinação ou  $R^2$ , considerados aceitáveis para valores superiores à 0,99 (INMETRO, 2007).

#### 4.1.3.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação das curvas de calibração usual de Imq e curva matrizada (em presença de componentes do placebo).

Para os dados obtidos foi aplicado o teste F (Fischer-Snedecor) afim de se verificar se as variâncias das amostras com Imq puro e fortificadas podem ser consideradas estatisticamente iguais, em todos os níveis de fortificação. Para isso  $F_{\text{calculado}}$  deve ser menor que  $F_{\text{crítico}}$  ( $\alpha = 0,05$ ).

Caso um nível de concentração obtenha  $F_{\text{calculado}}$  superior a  $F_{\text{crítico}}$ , o efeito de matriz deve ser analisado com a distribuição t de Student, e  $t_{\text{calculado}}$  deve ser inferior ao  $t_{\text{crítico}}$  em todos os níveis de fortificação para que o efeito matriz não seja considerado significativo.

#### 4.1.3.4 Precisão

Para avaliação da precisão intermediária do método desenvolvido foram preparadas amostras fortificadas com placebo nas concentrações de Imq de 0, 25 e 35  $\mu\text{g/mL}$ . Para cada nível de fortificação, a análise foi realizada em nove replicatas por analistas diferentes em dias distintos.

Os dados obtidos foram analisados por meio do cálculo dos seguintes parâmetros: concentrações médias, desvios-padrão e os coeficientes de variação (CV%) das amostras fortificadas em cada nível de concentração. Para o método ser considerado preciso CV deve apresentar valor inferior a 5% (INMETRO, 2007).

#### 4.1.3.5 Exatidão

Para determinação da exatidão foram analisadas soluções com padrão de trabalho de Imq nas concentrações de 10, 25, e 35 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicada por dois analistas em dias diferentes. A porcentagem de Imq adicionada foi calculada comparando as respostas obtidas com os valores de referência aceitos convencionalmente como verdadeiros.

Para o método ser considerado exato a média de recuperação deve estar entre 98,0 e 102,0% e o erro-padrão relativo deve ser inferior a 20%.

#### 4.1.3.6 Estabilidade

A estabilidade da amostras foi avaliada por meio da comparação dos sinais analíticos do padrão de trabalho de Imq contaminado com o placebo no momento do preparo e após 24 horas. As concentrações avaliadas foram de 10, 25 e 35 µg/mL e as análises foram realizadas em triplicatas.

Para confirmação de estabilidade das amostras, o coeficiente de variação (desvio-padrão relativo) das áreas deve ser inferior a 2%.

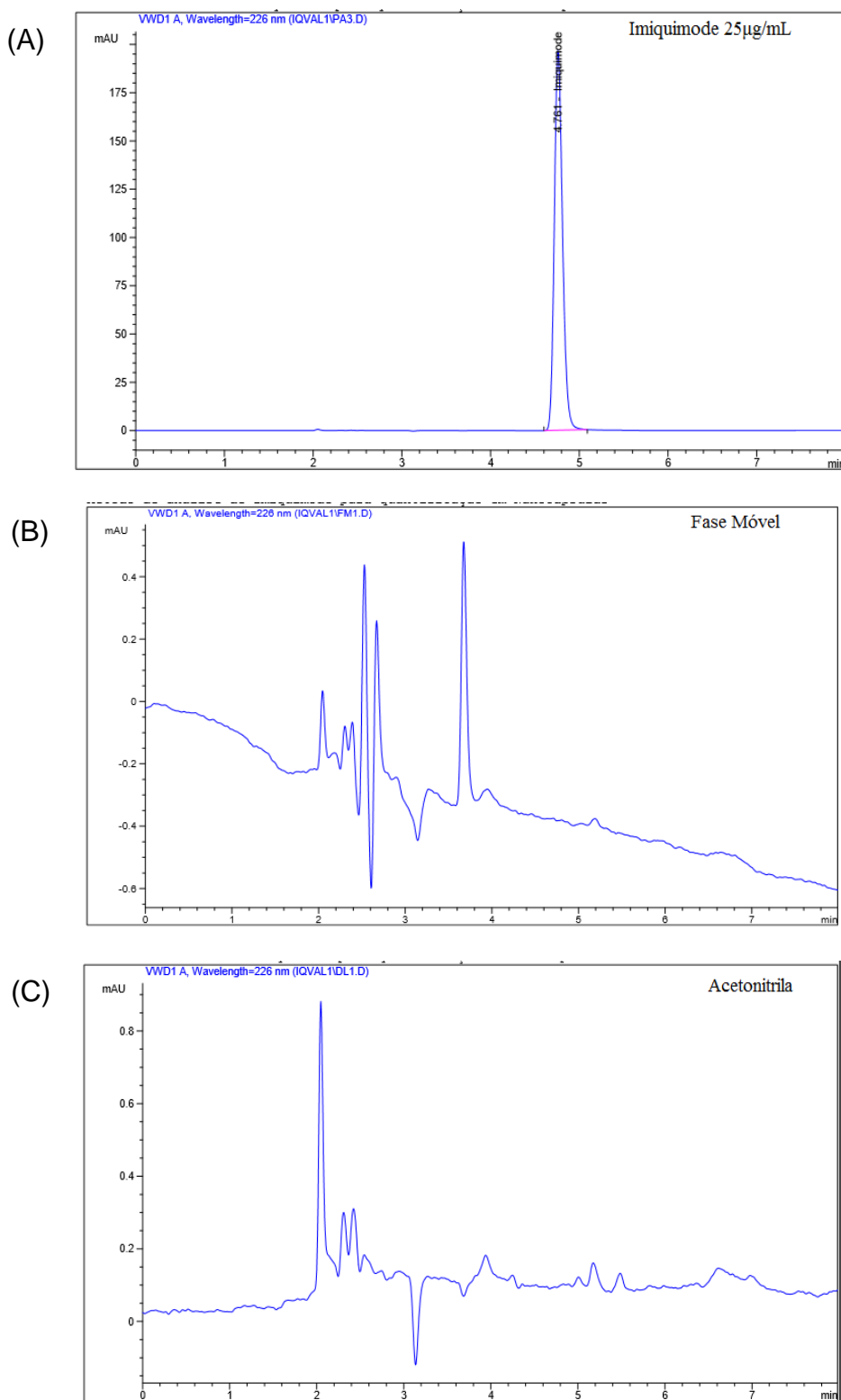
## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

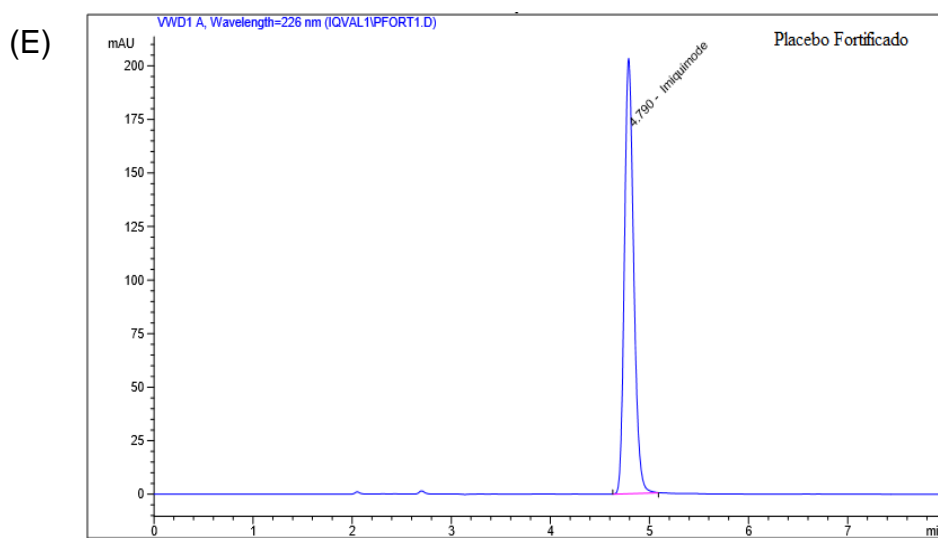
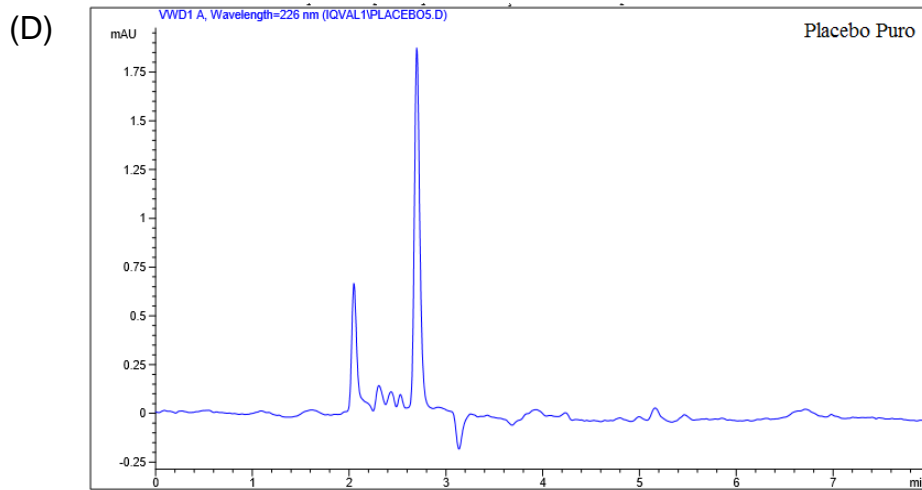
### 4.2.1 Validação do método analítico para quantificação de imiquimode em nanocápsulas por CLAE

#### 4.2.1.1 Seletividade

De acordo com os cromatogramas indicados na Figura 13, de A a E, é possível observar que nenhum dos componentes testados (fase móvel, acetonitrila e compostos do placebo) apresentaram picos interferentes significativos eluídos no mesmo tempo de retenção do Imq (4,78 min). Além disso, não foram observadas variações na área e no tempo de retenção do fármaco em presença da matriz no perfil do placebo fortificado. Desse modo, foi confirmada a seletividade do método proposto na presença dos demais componentes da matriz.

**Figura 13** – (A) Cromatograma do imiquimode a 25 µg/mL; (B) Cromatograma fase móvel; (C) Cromatograma do diluente; (D) Cromatograma do placebo; e (E) Cromatograma do placebo fortificado





Fonte: dados da pesquisa.

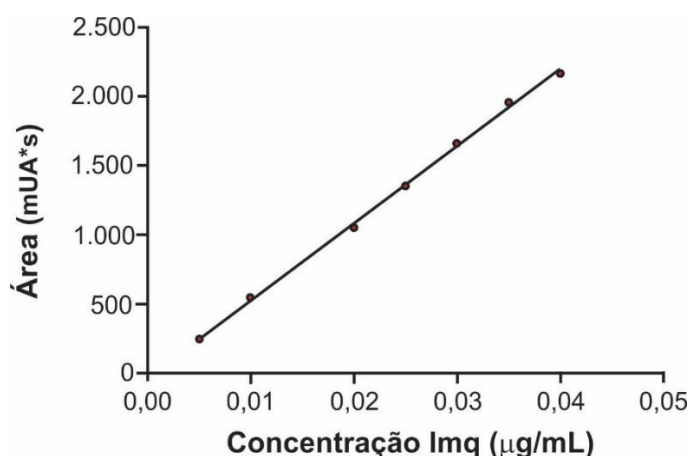
#### 4.2.1.2 Linearidade

A curva analítica referente à concentração de imiquimode *versus* área do sinal analítico (Figura 14), no intervalo de 5 a 40,0 µg/mL, foi definida pela seguinte equação:

$$y = 54959,0840x - 22,7147 \quad (1)$$

em que  $y$  corresponde à área do sinal analítico; e  $x$  corresponde à concentração (mg/mL).

**Figura 14** – Curva analítica de calibração do padrão de trabalho de imiquimode na faixa de 0,005 a 0,04 mg/mL.



Fonte: dados da pesquisa.

O coeficiente de correlação obtido ( $r$ ) foi de 1,0000, indicativo de uma correlação adequada entre a concentração de Imq e a área do pico. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da curva de calibração foi de 0,9999, atendendo aos parâmetros preconizados pela ANVISA.

A variância dos resíduos, determinada por meio do teste de Cochran, não foi considerada significativa, pois  $C_{\text{calculado}}$  de 0,2919 foi menor que  $C_{\text{tabelado}}$  de 0,5612, indicando homocedasticidade dos erros, ou seja, a dispersão dos dados em torno da reta da regressão linear foi uniforme. Desse modo, foi realizado o teste de resíduos padronizados Jackknife e apenas um valor extremo (*outlier*) foi detectado e removido, sendo que o limite máximo aceitável seriam de cinco valores ou 22,2% dos 21 dados originais (sete níveis de concentração analisados em triplica). O teste F-ANOVA indicou que não houve desvio de linearidade significativo uma vez que o  $F_{\text{calculado}}$ , de 0,001226504, apresentou valor inferior ao  $F_{\text{crítico}}$  ( $\alpha < 0,05$ ), de 3,555. Os resultados obtidos sugerem adequação dos dados ao modelo linear.

#### 4.2.1.3 Efeito matriz

Após as análises das replicadas das curvas matrizadas e não matrizadas, foi aplicado o teste F (Fischer-Snedecor), de homogeneidade de variâncias. No nível de fortificação 0,005 mg/mL,  $F_{\text{calculado}}$  foi superior ao  $F_{\text{crítico}}$ , considerando grau de liberdade equivalente a 2. Desse modo, o efeito matriz foi avaliado com a distribuição t de Student. Nesse teste, todos os níveis de fortificação apresentaram valores de  $t_{\text{calculado}}$

inferiores ao valor  $t_{\text{crítico}}$ , de 2,776, podendo-se concluir que a matriz não apresentou interferência estatisticamente significativa na quantificação do Imq.

#### 4.2.1.4 Precisão

Os valores obtidos na análise da precisão intermediária do método desenvolvido estão indicados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Valores de média, desvio-padrão e Coeficiente de Variância obtidos na análise de precisão do método analítico desenvolvido

| Concentração (mg/mL) | Média Geral | Desvio-Padrão | Coeficiente de Variação (%) |
|----------------------|-------------|---------------|-----------------------------|
| 0,010                | 0,010       | 0,00036       | 3,575                       |
| 0,025                | 0,025       | 0,00124       | 4,998                       |
| 0,035                | 0,034       | 0,00106       | 3,099                       |

Fonte: dados da pesquisa.

Observa-se que todos os coeficientes de variação calculados apresentaram valores inferiores à 5% e, portanto, estão de acordo com os parâmetros considerados aceitáveis (INMETRO, 2007).

#### 4.2.1.5 Exatidão

Os valores obtidos na análise de exatidão do método desenvolvido estão indicados na Tabela 2.

É possível notar que os valores das médias de recuperação estão entre 98 e 102% e os dados de erro-padrão relativo foram inferiores a 2% para todos os níveis de concentração, confirmando a exatidão do método.

**Tabela 2** – Valores de média, desvio-padrão, porcentagem de recuperação e erro-padrão relativo, obtidos na análise de exatidão do método analítico desenvolvido

| Concentração (mg/mL) | Média | Desvio-Padrão | Recuperação (%) | Erro-Padrão Relativo |
|----------------------|-------|---------------|-----------------|----------------------|
| 0,010                | 0,010 | 0,00011       | 98,054          | -1,95                |
| 0,025                | 0,025 | 0,00060       | 100,273         | 0,27                 |
| 0,035                | 0,034 | 0,00103       | 98,082          | -1,92                |

Fonte: dados da pesquisa.

#### 4.2.1.6 Estabilidade

Os resultados obtidos em diferentes dias de análise bem como o coeficiente de variação entre esses valores, indicados na Tabela 3, confirmam a estabilidade das amostras no período de 24 horas, uma vez que o coeficiente de variação para todos os níveis de concentração foi inferior à 2%.

**Tabela 3**– Valores das áreas obtidas na análise de estabilidade das amostras no período de 24 horas

| Concentração (mg/mL) | Área Após Preparo | Área Após 24 Horas | Coeficiente de Variação (%) |
|----------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|
| 0,010                | 549,7667          | 540,5500           | 1,19                        |
| 0,025                | 1388,4000         | 1404,0500          | 0,79                        |
| 0,035                | 1886,7000         | 1913,9500          | 1,01                        |

Fonte: dados da pesquisa.

### 4.3 CONCLUSÃO

O método para quantificação do Imq por CLAE foi validado conforme RDC nº 899 (ANVISA, 2011) e apresentou seletividade, exatidão, precisão e linearidade adequadas para a faixa de trabalho de 5 A 40 µg/mL.

## 5 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO IMIQUIMODE

---

### 5.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.1.1 Material

Imiquimode (Glenmark Generic LTD, Índia), copolímero de polimetacrilato massa molecular 125.000 g/mol (eudragit<sup>®</sup> L100, Evonik, Brasil), polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona, massa molecular 14.000 g/mol (Sigma Aldrich, Brasil), quitosana de baixa massa molecular 50.000-190.000 g/mol (Sigma Aldrich, Brasil), miristato de isopropila (Sigma Aldrich, Brasil), triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (Polytechno, Brasil), triolato de sorbitano (Span<sup>®</sup> 85, Sigma Aldrich, Brasil), copolímero de polioxi-etileno-polioxipropileno (Poloxamer 407, BASF, Alemanha), polissorbato 80 (Tween 80, Merck, Alemanha), acetona e metanol grau CLAE, dispositivo de filtração 30 KDa (Millipore, França). Todos os outros solventes utilizados foram grau analítico.

#### 5.1.2 Equipamentos

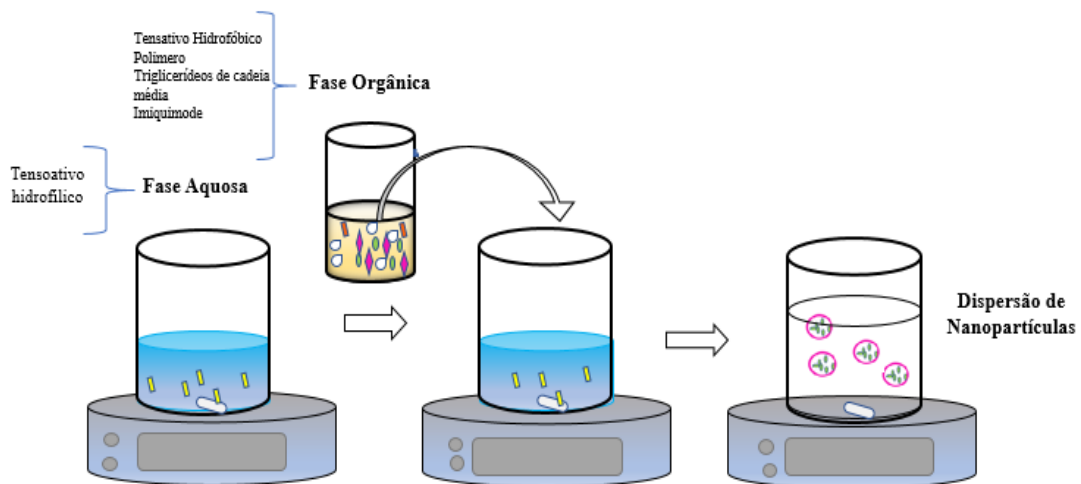
Sistema de purificação de água RiOs<sup>®</sup> (Millipore, EUA), balança analítica (Sartorius, Alemanha), agitador magnético (Nova ética, Brasil), capela de exaustão (Nalgon, Brasil), pHmetro (Digimed, Brasil), zetasizer nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra), mastersizer (Malven, Inglaterra), banho de ultrassom (Elma, Alemanha), cromatógrafo à liquido de alta eficiência (Agilent, EUA), microcentrífuga (Eppendorf, Alemanha), turbidímetro (Turbiscan<sup>®</sup>, EUA), Environ Shaker (Hyland Scientific, EUA), microscópio eletrônico de varredura FEG – Quanta 200 (FEI, EUA), microscópio eletrônico VEGA 3 SBH modelo EasyProbe, 30 kV (TESCAN, Brasil), analisador térmico DTG-60:SHIMADZU, espectrômetro de infravermelho (Perkin Elmer, EUA), microscópio óptico (Olympus, EUA).

### 5.1.3 Métodos

#### 5.1.3.1 Preparo de nanocápsulas contendo imiquimode

A formulação de nanocápsulas (NP) contendo imiquimode (NPImq) foi preparada pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado representado na Figura 15 (FESSI et al., 1989). A fase orgânica, constituída pelo fármaco, tensoativo de fase orgânica (Span 85), polímero e óleo, dissolvidos em acetona ou mistura de acetona e metanol (2:1) foi lentamente vertida na fase aquosa contendo Poloxamer 407 ou Tween 80 (tensoativos hidrofílicos) sob agitação de 100 rpm em agitador magnético à temperatura de 25 °C. Após 30 minutos de agitação o solvente foi evaporado em capela de exaustão também à temperatura de 25 °C.

**Figura 15** – Preparo de nanocápsulas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado.



Fonte: dados da pesquisa.

Uma vez que fatores como razão FA/FO, concentração e natureza dos componentes utilizados nesse método podem alterar as características físico-químicas das nanocápsulas formadas (RAO; GECKELER., 2011), foram testadas diferentes condições no preparo destas. Diferentes tipos de polímeros, tensoativos hidrofílicos, solventes, volume dos solventes orgânicos e concentrações do fármaco a ser encapsulado foram empregados. Estes parâmetros estão indicados no Quadro 7.

**Quadro 7** – Composição e variáveis testadas no desenvolvimento das formulações de nanocápsulas.

|                                 | <b>Componente</b> | <b>Reagente/Solvente</b>                 | <b>Concentração Final (mg/mL)</b> |
|---------------------------------|-------------------|--|-----------------------------------|
| Fase Orgânica<br>Volume = 30 mL | Polímero          | PCL ou eudragit® L100                    | 1,88                              |
|                                 | Tensoativo        | Span 85                                  | 1,25                              |
|                                 | Óleo              | TCM                                      | 2,5                               |
|                                 | Fármaco           | Imq                                      | 0,25; 0,5 ou 0,625                |
|                                 | Fase orgânica     | Acetona ou mistura acetona/metanol (2:1) | -                                 |
| Fase Aquosa<br>Volume = 40 mL   | Tensoativo        | Poloxamer 407 ou Tween 80                | 1,25                              |

\* A fase orgânica foi evaporada ao final do processo.

Fonte: dados da pesquisa.

Para a sequência dos trabalhos, foram selecionadas as dispersões em que não se observou formação de precipitados visíveis durante o preparo. As amostras selecionadas foram analisadas por difratometria à laser (DL) utilizando o equipamento Mastersizer 2000 e observadas por microscópio óptico para avaliação da presença de micropartículas nas formulações. A formulação sem a presença de agregados foi revestida com solução de quitosana (NPQTI<sub>m</sub>q). Para essa etapa 10 mL de solução de quitosana 0,05% (p/v) em ácido acético 0,5% (v/v) foram lentamente vertidos sobre a formulação e, em seguida, esta foi evaporada novamente até o volume final de 40 mL. Foram também preparadas formulações sem a presença do Imq com e sem revestimento de quitosana (NPQTPlacebo e NPPlacebo).

### 5.1.3.2 Morfologia

Para a realização da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram diluídas dez vezes em água purificada e gotejadas em porta amostras (*stubs*) com fita dupla face de carbono. Os suportes contendo as amostras foram armazenados em dessecador por 48 horas para secagem completa das dispersões que posteriormente foram visualizadas.

Para análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET), a formulação também foi diluída dez vezes em água purificada. Posteriormente 20 µL dessa dispersão foi colocada sobre um suporte holeycarbon com orifícios de aproximadamente 300 mesh e em seguida a amostra foi submetida a secagem à temperatura ambiente por 24 horas e analisada.

### 5.1.3.3 Análise térmica

Para avaliação de interações entre componentes da formulação de nanocápsulas desenvolvidas, foram realizadas análises por termogravimetria (TG) e por calorimetria exploratória diferencial ou DSC (*Differential Scanning Calorimetry*).

Realizou-se as análises por TG do Imq, da quitosana, do eudragit® L100, do triglicerídeo de cadeia média (TCM), da mistura física desses componentes na razão 1:1:1:1 e da NPQTI<sub>m</sub>q (nanocápsula polimérica com Imq revestida com quitosana) liofilizada. As curvas TG foram obtidas em módulo simultâneo TG/DTG e DTA.

As formulações NPI<sub>m</sub>q e NPQTI<sub>m</sub>q liofilizadas também foram analisadas por DSC. Para essas análises foram pesados aproximadamente 4mg de cada amostra em cadinho de alumina submetidos à um intervalo de temperatura entre 30 e 500 °C, com taxa de aquecimento constante de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio (50 mL por minuto).

### 5.1.3.4 Difração de raios X

Para detectar a presença de estrutura cristalina nas formulações desenvolvidas, os polímeros utilizados no preparo das dispersões de nanocápsulas (eudragit® L100 e quitosana), o Imq e as formulações NPI<sub>m</sub>q e NPQTI<sub>m</sub>q liofilizadas foram analisadas por difratometria de raios X à 40Kv e corrente de 30 mA. O ângulo de difração foi avaliado no intervalo de 3 e 60°, utilizando radiação CuK $\alpha$  como fonte de raios X, e comprimento de onda de 1,5406 Å.

### 5.1.3.5 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho por transformada de Fourier dos polímeros puros (eudragit® L100 e quitosana) e de sua mistura física 1:1 foram obtidos na faixa espectral de 4000 a 550 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e com 16 espectros por análise, em pastilhas de KBr.

### 5.1.3.6 Medida de pH

A variação do pH nas dispersões das nanocápsulas desenvolvidas foi determinado 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após o preparo. O eletrodo foi previamente calibrado em todas as medições e em seguida imerso diretamente no frasco com as amostras.

A leitura foi realizada a 25 °C, após estabilização do equipamento, e os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (DP).

#### 5.1.3.7 Distribuição de tamanho e índice de polidispersão

A determinação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão das formulações de nanocápsulas desenvolvidas foi realizada 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após o preparo pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (*Malvern Instruments*, Inglaterra). Para realização da análise foram utilizadas células de poliestireno de 1 cm de largura sob ângulo fixo de 90°. A análise foi realizada em triplicata, na temperatura de 25 °C e os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (DP).

#### 5.1.3.8 Potencial zeta

Para análise do potencial zeta foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (*Malvern Instruments*, Inglaterra) e este parâmetro foi determinado por mobilidade eletroforética. As formulações de nanocápsulas foram diluídas dez vezes em água ultrapura e em seguida o potencial zeta foi determinado em triplicata 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após o preparo, na temperatura de 25 °C.

#### 5.1.3.9 Solvente residual

O nível máximo de solventes presentes permitido internacionalmente segue as diretrizes do guia para solventes residuais do *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH).

Os solventes utilizados nas formulações desenvolvidas neste trabalho são classificados, de acordo com esse guia, como classe 3, no caso da acetona e classe 2 para o metanol. Para se determinar se as dispersões coloidais estavam de acordo com os limites estabelecidos, foi preparada uma solução-padrão aquosa desses solventes nas concentrações limite especificadas, de 5.000 ppm de acetona e 3.000 ppm de metanol. Em seguida, de 5 mL de cada formulação (NPImq e NPQTImq) recém-preparadas foram pipetadas para *vials* de 20 mL. As amostras foram analisadas utilizando-se a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS, do

inglês, *gas chromatography tandem mass spectrometry*), de acordo com método descrito no Quadro 8. As áreas dos cromatogramas obtidos foram comparadas.

**Quadro 8** – Parâmetros cromatográficos para análise de resíduo de metanol e acetona nas formulações de nanocápsulas de imiquimode com e sem revestimento de quitosana.

| <b>Método Cromatografia Gasosa</b> |                   |
|------------------------------------|-------------------|
| Temperatura do forno               | 40 °C             |
| Temperatura de injeção             | 140 °C            |
| Modo de injeção                    | Split             |
| Gás carreador                      | Hélio             |
| Modo de controle de fluxo          | Velocidade linear |
| Pressão                            | 12,1 kPa          |
| Fluxo total                        | 150,6 mL/min      |
| Fluxo na coluna                    | 1,46 mL/min       |
| Velocidade linear                  | 43,6 cm/seg       |
| Tempo total                        | 26 min            |

| <b>Método para Espectrometria de Massas</b> |  |
|---|--|
| Temperatura da fonte                        | 250 °C                                 |
| Temperatura da interface                    | 240 °C                                 |
| Solvente <i>cut time</i>                    | 1,6 min                                |
| Voltagem do detector                        | Relativo ao resultado do <i>tuning</i> |

Fonte: dados da pesquisa.

#### 5.1.3.10 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) do Imq nas dispersões coloidais desenvolvidas foi determinada por meio da quantificação de fármaco total e livre presente em cada formulação.

Para quantificar o total de fármaco, 400 µL de cada formulação (nanocápsula revestida e não revestida com quitosana) foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL. Em seguida, foram adicionados 2 mL de acetonitrila sobre ambas formulações e os balões foram colocados em um banho de ultrassom sem aquecimento durante 30 minutos. Após esse período, os balões foram aferidos com a solução de octa-nossulfonato de sódio e acetonitrila na proporção de 55:45 e seu conteúdo filtrado em filtro Millipore 0,45 µm para vials. As amostras foram analisadas por CLAE, utilizando método já validado. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Para doseamento da quantidade de fármaco livre foi utilizado o método de ultrafiltração/centrifugação. 500 µL de cada formulação (nanocápsula revestida e não revestida com quitosana) foram transferidos para unidades de ultrafiltração de 30 KDa. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação por 30 minutos na velocidade de 4.000 rpm. 160 µL dos filtrados foram transferidos, cada um, para balões volumétricos de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 0,8 mL de acetonitrila sobre as formulações. Os balões foram aferidos com a solução de octanossulfonato de sódio e acetonitrila na proporção de 55:45. As soluções foram filtradas em filtro 0,45 µm para vials e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando método já validado. Cada amostra foi analisada em triplicata.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi então calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$EE\% = \frac{(Fármaco\ total - Fármaco\ livre)}{Fármaco\ total} \times 100 \quad (3)$$

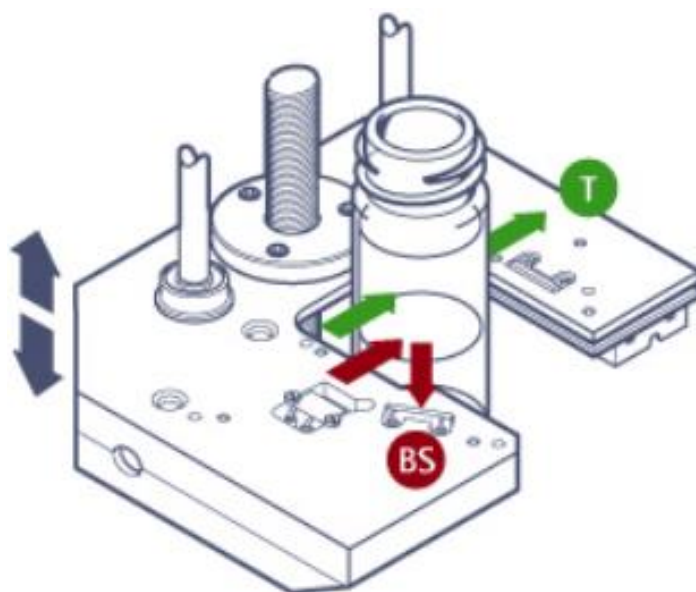
As áreas dos picos obtidos no doseamento do fármaco livre e total foram comparadas as áreas de diferentes concentrações do imiquimode através de uma curva de calibração do fármaco em solução. As concentrações utilizadas na curva (5, 20 e 40 µg/mL do Imq) estavam na faixa correspondente ao intervalo de concentração utilizado na validação do método, de 5 à 40 µg/mL.

#### 5.1.3.11 Estabilidade

A caracterização óptica das formulações de nanopartículas desenvolvidas foi realizada com a utilização do equipamento Turbiscan® (Formulation, EUA), capaz de determinar a estabilidade de sistemas coloidais à longo prazo (CELIA et al., 2009). Fenômenos de instabilidade como floculação, coalescência, cremagem e sedimentação podem ser identificados de modo eficiente por essa técnica (OLEJNIK et al., 2015).

Para avaliação desses fenômenos, uma fonte de luz infravermelha pulsada ( $\lambda = 880$  nm) incide em uma cubeta contendo a formulação a ser analisada. A luz que atravessa a amostra é detectada por um sensor de transmissão (T) localizado a 180° da fonte de luz, e a luz refletida pela mesma amostra é mensurada pelo detector de *backscattering* (BS) a 45° da fonte de radiação (Figura 16). Os perfis de transmissão e *backscattering* são obtidos simultaneamente a cada 40 µm.

**Figura 16** – Representação esquemática de detecção da luz transmitida e retroespalhada pelo Turbiscan Lab Expert.



Fonte: adaptada de Turbiscan (2015).

Nas análises realizadas no Turbiscan®, 15 mL da formulação recém-preparada foram adicionados em uma célula cilíndrica de vidro borossilicato de 55mm. A célula foi submetida a varreduras por feixe de luz a cada 5 minutos durante 1 hora, uma vez por semana, durante cinco semanas seguidas. Entre as medições as amostras foram armazenadas verticalmente à 25 °C e não foram manipuladas.

A variação de *backscattering* (BS) foi o parâmetro avaliado, pois o perfil T foi próximo de 0% para todas as amostras. O perfil de BS em  $t = 0$  foi usado como linha de referência e foi subtraído dos perfis obtidos nas medições subsequentes.

Os dados foram analisados por meio do *software* Turbisoft® para avaliação de fenômenos de instabilidade como migração e variação de tamanho das partículas nesses sistemas.

#### 5.1.3.12 Estudo de liberação *in vitro*

Para avaliar o perfil liberação *in vitro* das nanocápsulas desenvolvidas foi utilizado o método de difusão em membrana de diálise.

Para o estudo, 1 mL das dispersões de nanocápsulas, 1 mL da formulação comercial do Imq e o mesmo volume do Imq livre (em solução de tampão acetato pH 3,6) foram colocadas em um saco de diálise de 12 a 14 KDa. Todas as amostras foram

utilizadas na concentração de 250µg/mL de Imq. Para diluição da formulação comercial do Imq, disponível na concentração de 5mg do fármaco por grama do creme, 200mg do produto comercial foram pesados e diluídos em 40 mL de água purificada. A emulsão óleo em água obtida foi homogeneizada em agitador magnético por 30 minutos à 100 rpm obtendo-se uma concentração final de 250 µg/mL. As membranas de diálise foram acondicionadas em béqueres contendo 50 mL de tampão acetato pH 5,6. A solubilidade do Imq nessa solução foi determinada previamente. Esse sistema foi mantido em um agitador orbital na temperatura de 32 °C na velocidade de 100 rpm durante 24 horas. Após intervalos predefinidos (5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 1.440 e 1.620 minutos), alíquotas de 1 mL foram retiradas da solução receptora e substituídas por 1 mL do tampão afim de manter o volume constante e garantir a condição *sink*. As amostras coletadas foram filtradas em filtro 0,45 µm e a concentração do fármaco determinada por CLAE utilizando método previamente validado.

#### 5.1.3.13 Análise estatística

Para comparação dos resultados das análises de tamanho, Pdl, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação foi utilizado o teste T pareado, com valor de  $p < 0,05$  aceito para diferenças estatisticamente significativas. Para essas análises foi utilizado o programa GraphPad Prim® 5.

## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2.1 Preparo de nanocápsulas contendo imiquimode

A técnica de escolha para desenvolvimento das formulações foi a nanoprecipitação ou precipitação do polímero pré-formado descrita por Fessi et al. (1989), uma vez que este método é simples, relativamente rápido e reprodutível (RAO; GECKELLER., 2011). Todas as formulações listadas na Tabela 4 foram preparadas e somente os testes “F” e “G” não apresentaram formação de precipitados e agregados visíveis. As formulações com melhores resultados foram selecionadas para dar continuidade aos estudos.

Entre os tensoativos testados, a utilização do Poloxamer 407 na fase aquosa e de Span 85 na fase orgânica foi mais efetiva na obtenção de partículas de diâmetro reduzido comparativamente aos demais testes. A formulação com Tween 80 na

mesma concentração apresentou microagregados logo após o preparo o que não ocorreu nos testes “F” e “G”.

A utilização da mistura acetona/metanol também levou à redução do tamanho das partículas formadas quando comparada ao uso somente da acetona. Uma hipótese para esse resultado seria a menor velocidade de difusão da acetona com a fase aquosa comparada à taxa de difusão da mistura acetona e metanol, uma vez que quanto mais lento esse processo, mais desfavorecida é a formação de partículas menores (BILATI et al., 2005; YE; SQUILLANTE., 2013).

**Tabela 4** – Composição das formulações de nanocápsulas testadas.

| Formulação | [Imq] µg/MI | Polímero | FO           | Volume FO (mL) | Volume FA (mL) | Tensoativo FA |
|------------|-------------|----------|--------------|----------------|----------------|---------------|
| A          | 250         | PCL      | Acetona      | 20             | 40             | Tween 80      |
| B          | 250         | PCL      | Acetona      | 20             | 40             | Poloxamer 407 |
| C          | 250         | Eudragit | Acetona      | 20             | 40             | Tween 80      |
| D          | 250         | Eudragit | Acetona      | 30             | 40             | Poloxamer 407 |
| E          | 250         | Eudragit | Acet/Metanol | 30             | 40             | Tween 80      |
| F          | 250         | Eudragit | Acet/Metanol | 30             | 40             | Poloxamer 407 |
| G          | 500         | Eudragit | Acet/Metanol | 30             | 40             | Poloxamer 407 |
| H          | 500         | Eudragit | Acet/Metanol | 30             | 40             | Tween 80      |
| I          | 625         | Eudragit | Acet/Metanol | 30             | 40             | Poloxamer 407 |

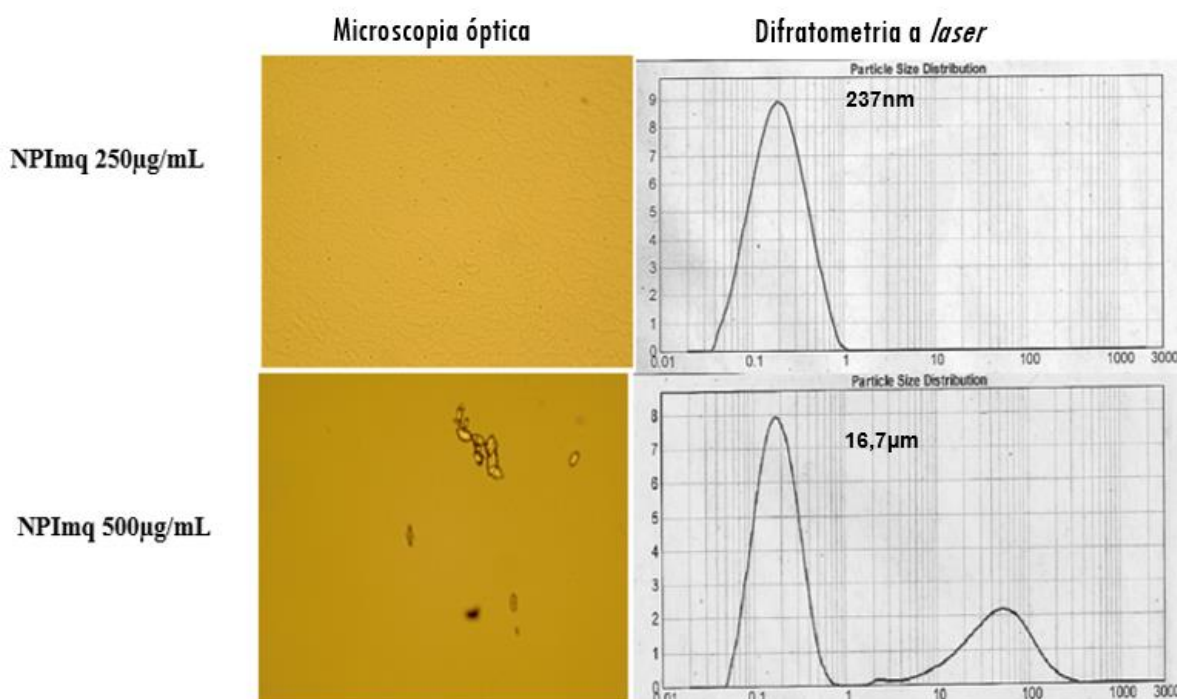
Fonte: dados da pesquisa.

Efeito similar foi observado no desenvolvimento de nanocápsulas de eudragit<sup>®</sup> RL100 contendo acetazolida. A mistura acetona/metanol na fase orgânica levou à formação de partículas menores quando comparadas ao uso somente da acetona como solvente. Foi observado que esse efeito se correlacionava à constante dielétrica desses componentes, porém o mecanismo não foi elucidado (VERMA et al., 2013).

Os perfis de difratometria a laser, bem como as imagens observadas em microscópio óptico das formulações “F” e “G” estão representados na Figura 17. Observa-se que a dispersão de maior concentração do fármaco, identificada como “G” na Tabela 8, apresentou distribuição de tamanho bimodal com presença de agregados micrométricos 15 dias após armazenamento e um D [4,3] ou diâmetro médio de 16,699 µm, enquanto a formulação de menor concentração ou “F” apresentou uma única população de partículas com tamanho médio de 0,237 µm. Esse resultado poderia ser explicado pela supersaturação do fármaco na fase dispersante da amostra “G” após evaporação completa dos solventes, levando possivelmente a formação e

agregação de cristais simultaneamente à presença de nanocápsulas (POHLMANN et al., 2008). Essa hipótese é corroborada pelas imagens obtidas em microscópio óptico nas quais pode-se notar a presença de microagregados na formulação NPImq 500 µg/mL, o que não ocorre em NPImq 250 µg/mL.

**Figura 17** – Imagens observadas em microscópio óptico e perfis de difratometria a *laser* das formulações selecionadas.



NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

Resultado similar a este foi encontrado em estudos já publicados na literatura. Por exemplo, em 2008, Friedrich et al. (2008) avaliaram o efeito da concentração de dexametasona em formulações de nanocápsulas poliméricas. Nesse estudo, a formulação de maior concentração (1,0 mg/mL) apresentou formação de cristais visualizados por meio de microscopia óptica enquanto concentrações menores (0,5 e 0,25 mg/mL) levaram a obtenção de dispersões coloidais adequadas, sem a formação de agregados ou de cristais do fármaco.

Em outro trabalho, nanopartículas de PLGA contendo diferentes tipos de xantanas também apresentaram formação de estruturas cristalinas apenas nos testes contendo maiores concentrações do ativo. Este resultado foi associado à capacidade

máxima de encapsulação alcançada pela partícula desenvolvida (TEIXEIRA et al., 2005).

Levando em consideração os resultados apresentados, a formulação “F”, que apresentou aspecto opalescente, branco, homogêneo, fluido e sem a presença de precipitados, foi selecionada. A fotografia da formulação “F”, denominada NPImq, da formulação com revestimento de quitosana (NPQTImq) bem como as amostras placebo (sem o imiquimode) com e sem revestimento (NPQT e NP) estão representadas na Figura 18.

**Figura 18** – Imagens das formulações desenvolvidas.



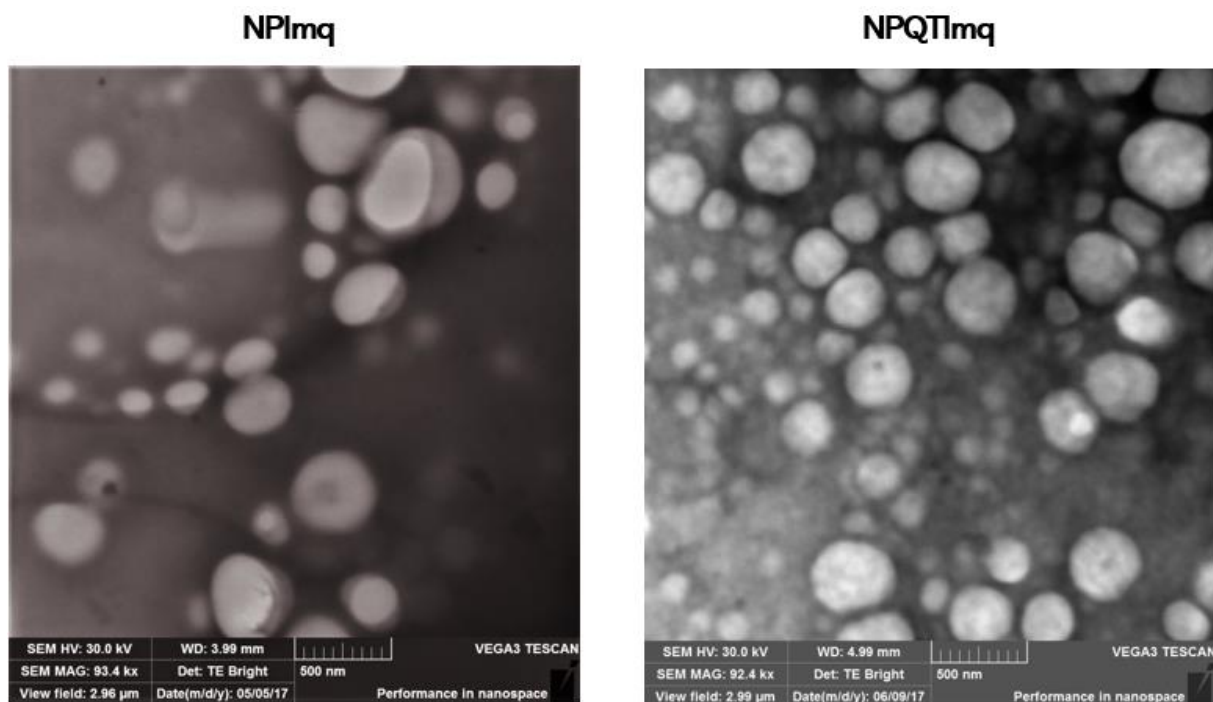
NPPlacebo = nanocápsula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanocápsula polimérica placebo revestida com quitosana; NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

### **5.2.2 Morfologia**

As fotomicrografias das NPImq e NPQTImq obtidas por MEV (Figura 19-A e 19-B) e por MET (Figura 19-C e 19-D) permitem verificar que algumas partículas apresentaram formato esférico enquanto outras tinham características amorfas. O tamanho observado nas imagens, em torno de 200 a 300 nm, está de acordo com os valores encontrados nas medidas realizadas por DLS.

Figura 19 – Morfologia NPImq e NPQTIImq determinada por MET



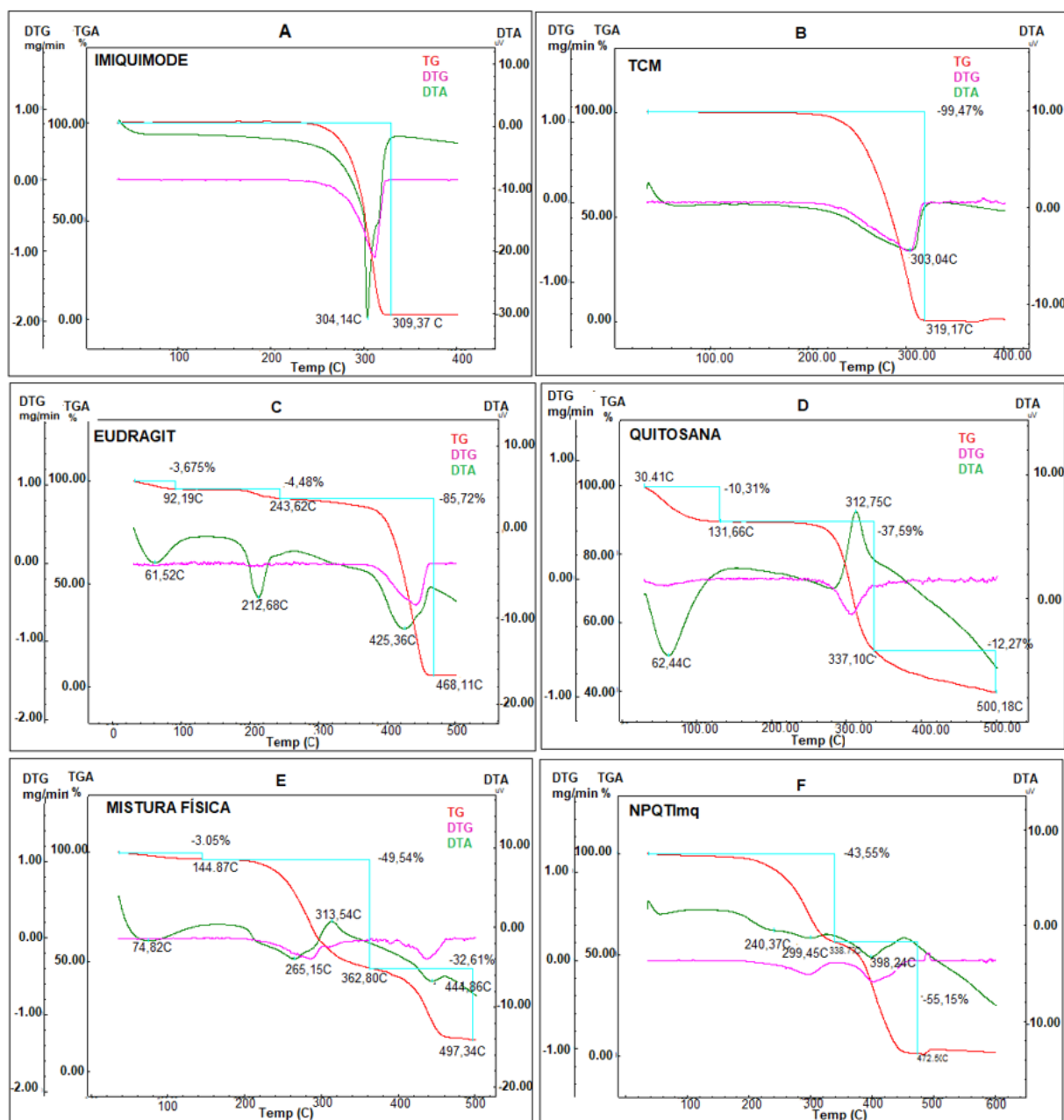
NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTIImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

### 5.2.3 Análises térmicas

As curvas TG/DTG e DTA obtidas dos componentes Imq, TCM (triglicerídeo de cadeia média), eudragit® L100, quitosana, da mistura física Imq:TCM: eudragit® L100:quitosana na razão de 1:1:1:1 e NPQTIImq liofilizada estão representadas na Figura 20. Na curva TG do Imq puro (Figura 20-A) observa-se a perda de massa em apenas uma etapa que se inicia a 215,4 °C. A curva DTA do fármaco apresentou apenas um evento endotérmico, representado pelo pico descendente do gráfico, na temperatura de 300,4 °C, que corresponde ao intervalo de fusão para o fármaco puro, já descrito na literatura (RAMINEMI et al., 2013).

**Figura 20** – Curva TG/DTG e DTA (A) Imq puro, (B) TCM, (C) eudragit® L100, (D) quitosana, (E) mistura física Imq:TCM:eudragit® L100:quitosana, (F)NPQTImq.



NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

A curva TG do TCM (Figura 20-B) indicou estabilidade térmica até cerca de 240 °C. Após essa temperatura, observa-se a decomposição da amostra em uma única etapa.

A curva DTA do eudragit® L100 (Figura 20-C) mostrou um evento endotérmico entre 30 e 100 °C, decorrente da perda de água superficial. Isso foi confirmado pela curva TG, que apresentou perda de massa de 3,7% nessa faixa de temperatura. Entre 120 e 180 °C o polímero manteve-se estável, sem perda de massa na curva TG ou

eventos térmicos na curva DTA. Entre 180 e 260 °C observa-se perda de massa associada à quebra de ligações de hidrogênio intermolecular e formação de anidrido com eliminação de água e entre 340 e 480°C ocorre perda de massa de 85,72% evidenciando decomposição térmica do polimetacrilato na curva TG (RIZI et al., 2011).

Na curva TG da quitosana (Figura 20-D) foram observados três eventos de perda de massa. O primeiro, entre 30 e 132 °C, com perda de massa de 10,3%, está associado à desidratação da amostra. Nessa faixa de temperatura a curva DTA apresenta um pico endotérmico relacionado ao processo de desidratação. O segundo evento na curva TG, entre 260 e 340 °C, apresentou perda de massa de 37,5% e está relacionado à decomposição da quitosana, representado na curva DTA pelo pico exotérmico em 312,7 °C. O terceiro evento na curva TG também é relativo à decomposição do polímero e apresentou perda de massa de 12,2%, entre 337 e 500 °C (SANTOS et al., 2003).

Para a mistura física (Figura 20-E) foram observados três eventos de perda de massa, o primeiro, entre 30 e 144 °C possivelmente está associado à perda de água superficial dos componentes misturados uma vez que a eliminação da água também foi observada nas curvas da quitosana (Figura 20-D) ( $\Delta m = 10,31\%$ ) e do eudragit® L100 (Figura 20-C) ( $\Delta m = 3,67\%$ ) puros, na mesma faixa de temperatura. O segundo evento de perda de massa na mistura física ocorre na faixa de temperatura entre 240 e 362 °C, e pode estar relacionado a perda de água intermolecular do eudragit® L100 (RIZI et al., 2011), e também à decomposição do TCM, que ocorrem no mesmo intervalo de temperatura e são processos endotérmicos, observados na curva DTA do eudragit® L100 e TCM puros e na curva DTA da mistura física. Nesse intervalo de temperatura também ocorre a degradação da quitosana, evidenciada pelo pico exotérmico da curva DTA em 313,2 °C que também é observado na curva da quitosana pura (Figura 20-D) (SANTOS et al., 2003).

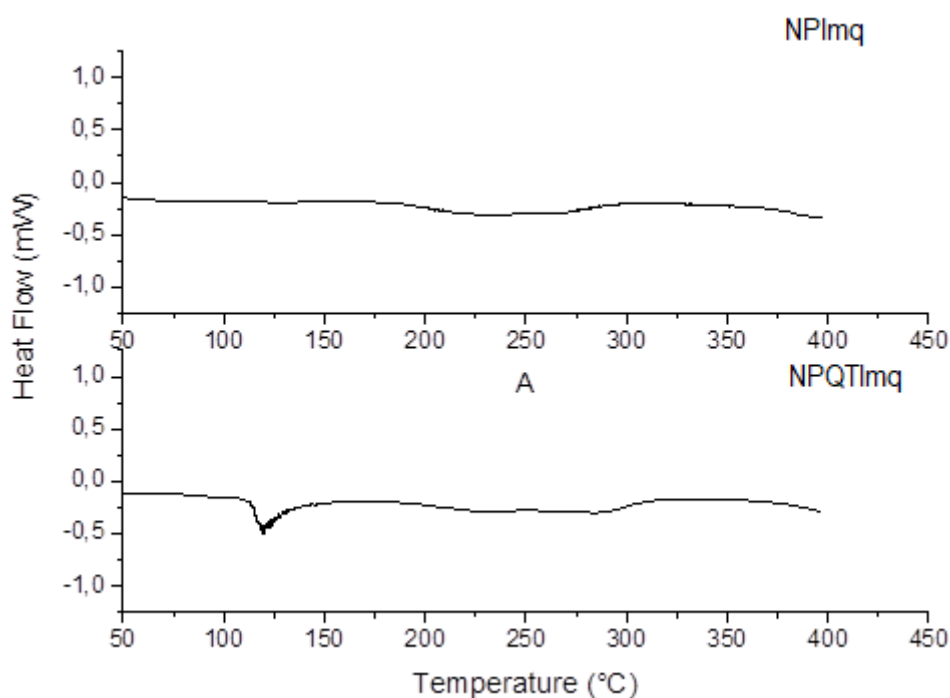
O terceiro evento de perda de massa observado na curva TG da mistura física, entre 362 e 487 °C, pode estar associado tanto à decomposição térmica do eudragit® L100 como à decomposição final da quitosana, que ocorrem no mesmo intervalo de temperatura.

Para a NPQTI<sub>m</sub>q (Figura 20-F) são observados dois eventos de perda de massa, o primeiro entre 260 e 340 °C pode indicar, assim como na mistura física, eliminação de água ligada do eudragit® L100 (RIZI et al., 2011) ou degradação do

TCM. No entanto o evento exotérmico referente à decomposição da quitosana tem seu pico deslocado para uma temperatura maior (de 313 para 480 °C), sugerindo interação da quitosana e os demais componentes na forma de dispersão coloidal.

Para confirmar a hipótese de interação entre a quitosana e os demais componentes, foi realizada análise de DSC das formulações com e sem a quitosana (Figura 21).

**Figura 21** – Curvas DSC das formulações NPImq (acima) e NPQTImq.



NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

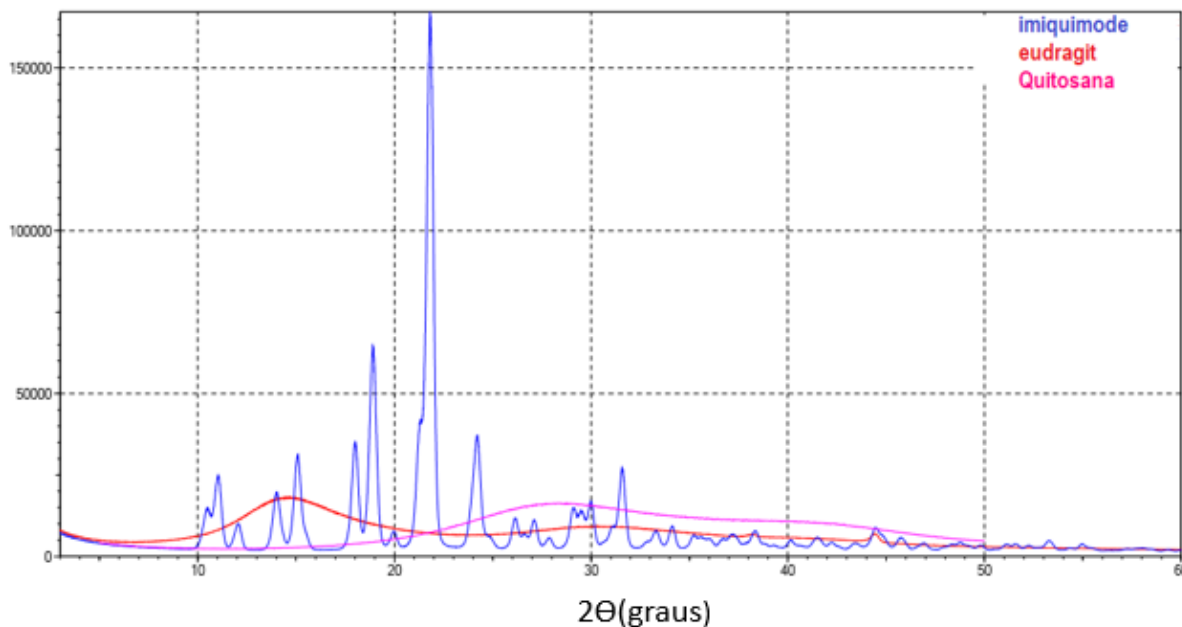
Pode-se observar que a curva DSC da formulação contendo quitosana apresenta um pico endotérmico em 120 °C que está ausente na curva da formulação sem esse componente, e também ausente na curva DTA da quitosana pura, o que é um forte indício de interação entre esse polímero e o restante da formulação.

#### **5.2.4 Difração de raios X**

Os picos bem definidos do Imq obtido nas análises por difração de raio X podem ser observados na Figura 22 e são atribuídos à estrutura altamente cristalina desse fármaco (GUPTA et al., 2014). Nos difratogramas tanto do eudragit® L100 como da

quitosana, não se notam picos bem delimitados, indicativo de que esses polímeros apresentam estrutura amorfa.

**Figura 22** – Difratometria de raios X do imiquimode puro, eudragit® L100 e quitosana.

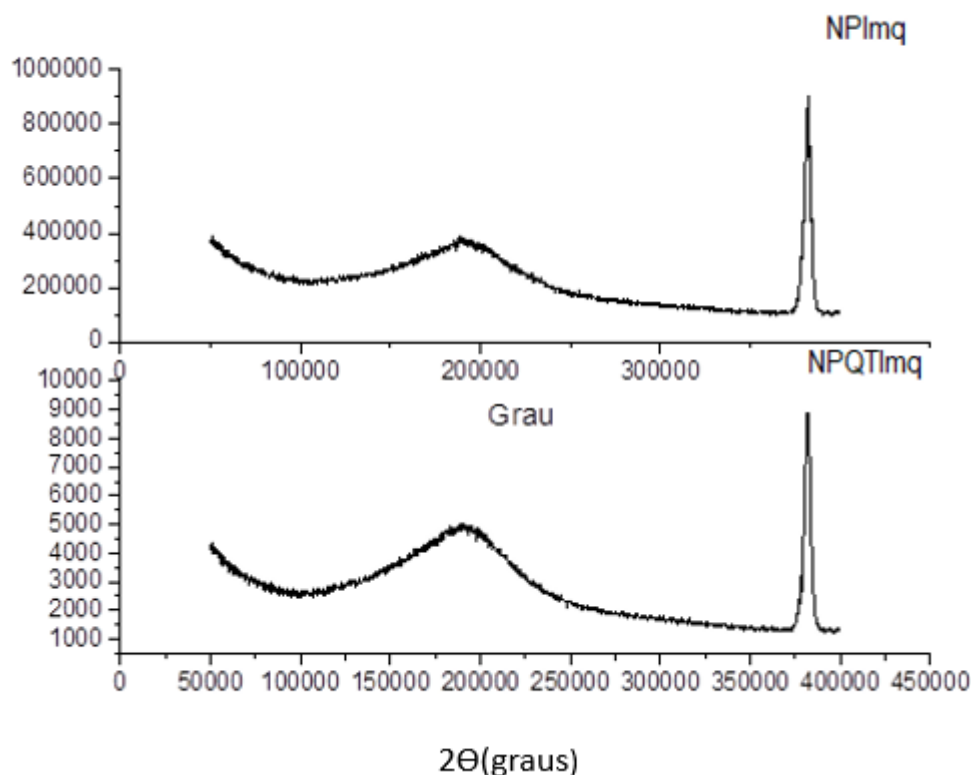


Fonte: dados da pesquisa.

Um padrão associado às estruturas amorfas também pôde ser observado nas dispersões coloidais liofilizadas, NPImq e NPQTImq na Figura 23, cujo perfil não apresenta picos bem definidos, o que é um indício de que o método de preparação das formulações causa amorfização do fármaco. Não foi observada nenhuma diferença entre os difratogramas das amostras NPImq e NPQTImq, não confirmando, assim, a interação observada por DSC. Isso é justificável pelo fato de que a difração de raios X é útil para o estudo de material cristalino, e pode-se observar pelos difratogramas que ambas as amostras são amorfas.

Resultados similares foram encontrados por WU e colaboradores (2008) na caracterização de nanopartículas compostas por eudragit® E e por álcool polivinílico (PVA) contendo quercetina. Os difratogramas obtidos das partículas liofilizadas nesse estudo não apresentaram picos característicos de estrutura cristalina o que foi atribuído à encapsulação da quercetina e, ou, sua dispersão na matriz polimérica eudragit-PVA. Adibikia et al. (2011) observaram esse mesmo efeito em nanopartículas de eudragit® RS100 contendo naproxeno, sendo o padrão de difração dessas dispersões um forte indício da dispersão do fármaco nesses nanocarreadores.

**Figura 23** – Difratomia de raios X das formulações NPImq e NPQTImq.



Fonte: dados da pesquisa.

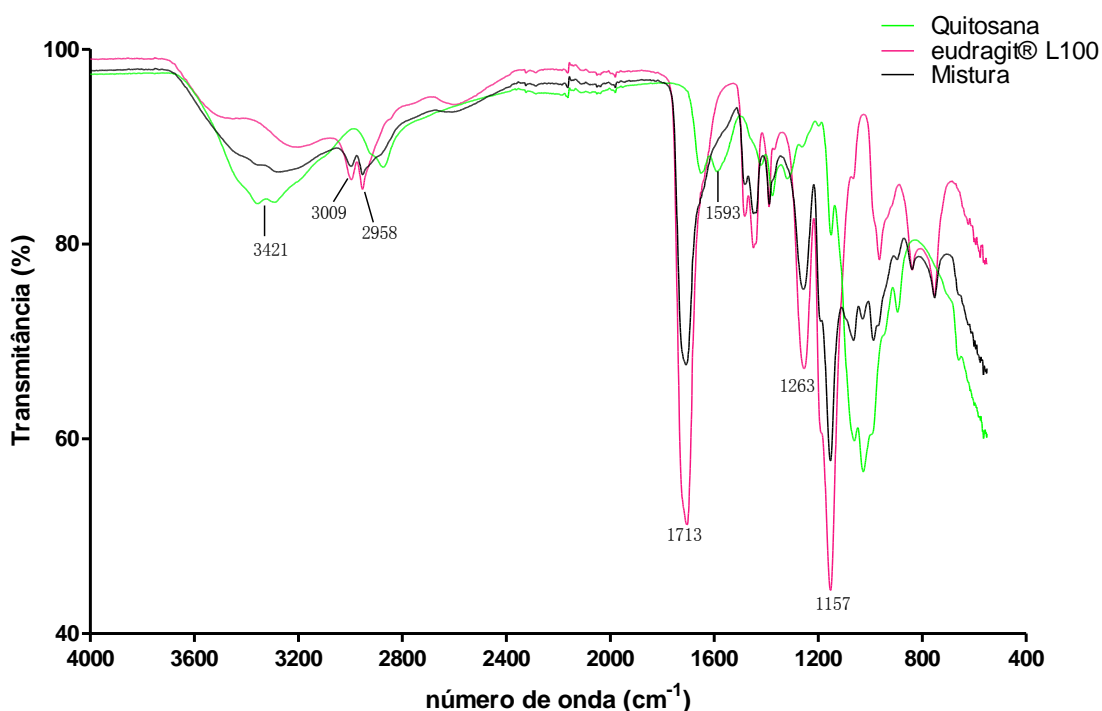
### **5.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho**

Os espectros na região do infravermelho (IV) obtidos dos polímeros puros e de sua mistura 1:1 estão indicados na Figura 24. O espectro do eudragit® L100 apresenta uma banda larga, característica do estiramento de grupos hidroxila (O-H) na faixa de número de onda entre 3509 e 3109  $\text{cm}^{-1}$ , duas bandas características de grupamentos metil e metileno (C-H) em 3009 e 2958  $\text{cm}^{-1}$ , uma banda intensa em 1713  $\text{cm}^{-1}$ , característica do estiramento assimétrico do grupo carbonila (C=O) e duas bandas relativas ao estiramento assimétrico de ligações éster (C-O) em 1263 e 1157  $\text{cm}^{-1}$ .

A quitosana apresenta bandas características de estiramento simétrico e deformação angular de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) em 3421 e 1593  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, além do estiramento de grupamentos amida (NH) em 1620  $\text{cm}^{-1}$ . Na mistura 1:1 dos dois polímeros, os picos referentes aos grupamentos  $\text{NH}_2$  da quitosana em torno de 3421  $\text{cm}^{-1}$ , bem como as bandas referentes ao C=O e ligações C-O do eudragit® L100, permanecem no espectro. No entanto, a banda característica da deformação da amina primária, em 1593  $\text{cm}^{-1}$ , da quitosana não é observada o que possivelmente ocorreu

devido ao deslocamento desse pico para região de menor frequência. Esse resultado poderia ser atribuído a ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos carboxílicos do eudragit® L100 e o NH<sub>2</sub> da quitosana, já descrita em estudos prévios e atribuída à interação eletrostática entre esses grupamentos e à miscibilidade entre os dois polímeros (THAKRAL et al., 2010; HAQUE et al., 2012; FAISAL et al., 2018). Dessa forma, os dados obtidos indicam a presença de interações entre os polímeros analisados confirmando a interação observada através da DSC no presente trabalho.

**Figura 24** – Espectro IV dos polímeros eudragit® L100 e quitosana puros e das misturas 1:1.



Fonte: dados da pesquisa.

### 5.2.6 pH

Para as NPPlacebo, NPImq e NPQTImq não ocorreram variações nos valores de pH estatisticamente significativas ao longo do período avaliado (Tabela 5). No entanto, a formulação sem o fármaco e com o revestimento catiônico apresentou uma variação relevante no intervalo de 35 dias. Essa variação pode estar associada à redução do pH no meio circundante que resultaria na protonação dos grupos carboxílicos (PROIKAKIS et al., 2006) do eudragit® L100 levando ao enfraquecimento da interação com a quitosana, observada nos estudos de DSC e IV. Uma vez que os

polímeros utilizados são ácido e base fracos, seu grau de ionização irá depender do pH do meio (CALIJA et al., 2015).

Pode-se observar também que a incorporação do Imq às nanocápsulas resultou aumento do pH em ambas dispersões coloidais, com e sem revestimento de quitosana, o que pode estar relacionado às interações do fármaco com os polímeros utilizados e ao fato do Imq ser considerado uma base fraca, com pka de 7,3 (TELÒ et al., 2016; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ., 2015). Além disso, as NP revestidas obtiveram um valor mais baixo de pH quando comparados ao valor das NP não revestidas o que pode ser atribuído a utilização de ácido acético diluído para solubilização da quitosana no preparo do revestimento (VIEIRA et al., 2016).

**Tabela 5** – Valores de pH obtidos para NP desenvolvidas nos intervalos de 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após preparo

| <b>Tempo (dias)</b> | <b>NPPlacebo (pH ± DP)</b> | <b>NPQTPlacebo (pH ± DP)</b> | <b>NPImq (pH ± DP)</b> | <b>NPQTImq (pH ± DP)</b> |
|---------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------|
| 0                   | 4,57 ± 0,04                | 3,29 ± 0,02*                 | 5,41 ± 0,09            | 3,74 ± 0,03              |
| 7                   | 4,59 ± 0,08                | 3,30 ± 0,06                  | 5,32 ± 0,06            | 3,74 ± 0,02              |
| 14                  | 4,50 ± 0,08                | 3,33 ± 0,06                  | 5,37 ± 0,06            | 3,83 ± 0,01              |
| 21                  | 4,62 ± 0,09                | 3,43 ± 0,02                  | 5,36 ± 0,05            | 3,89 ± 0,03              |
| 28                  | 4,54 ± 0,16                | 3,39 ± 0,15                  | 5,38 ± 0,06            | 3,88 ± 0,03              |
| 35                  | 4,34 ± 0,03                | 3,43 ± 0,03*                 | 5,41 ± 0,05            | 3,83 ± 0,18              |
| p valor             | 0,819                      | 0,013                        | 0,511                  | 0,195                    |

\* Valores que apresentam diferença estatisticamente significativa considerados para  $p < 0,05$ .

DP = desvio-padrão; n = 3; NPPlacebo = nanocápsula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanocápsula polimérica placebo revestida com quitosana; NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

### **5.2.7 Distribuição de diâmetro e índice de polidispersão (IP)**

O diâmetro e o IP das formulações desenvolvidas estão representados na Tabela 10 e os gráficos relativos à distribuição do tamanho das amostras no dia de preparo e após 35 dias estão indicados na Tabela 6 e nas Figuras 25 e 26.

A espectroscopia de correlação de fótons é um método eficaz na determinação de fenômenos como inchamento, dissolução e cinética de erosão de nanopartículas. Isso pode ser com base no princípio de que durante o inchamento do polímero, o tamanho das partículas aumenta e no caso de erosão ou dissolução ocorre aumento

significativo no valor do índice de polidispersão (IP) além de redução no diâmetro (SAHLE et al., 2017).

**Tabela 6** – Valores de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão obtidos para as dispersões desenvolvidas nos intervalos de 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após preparo.

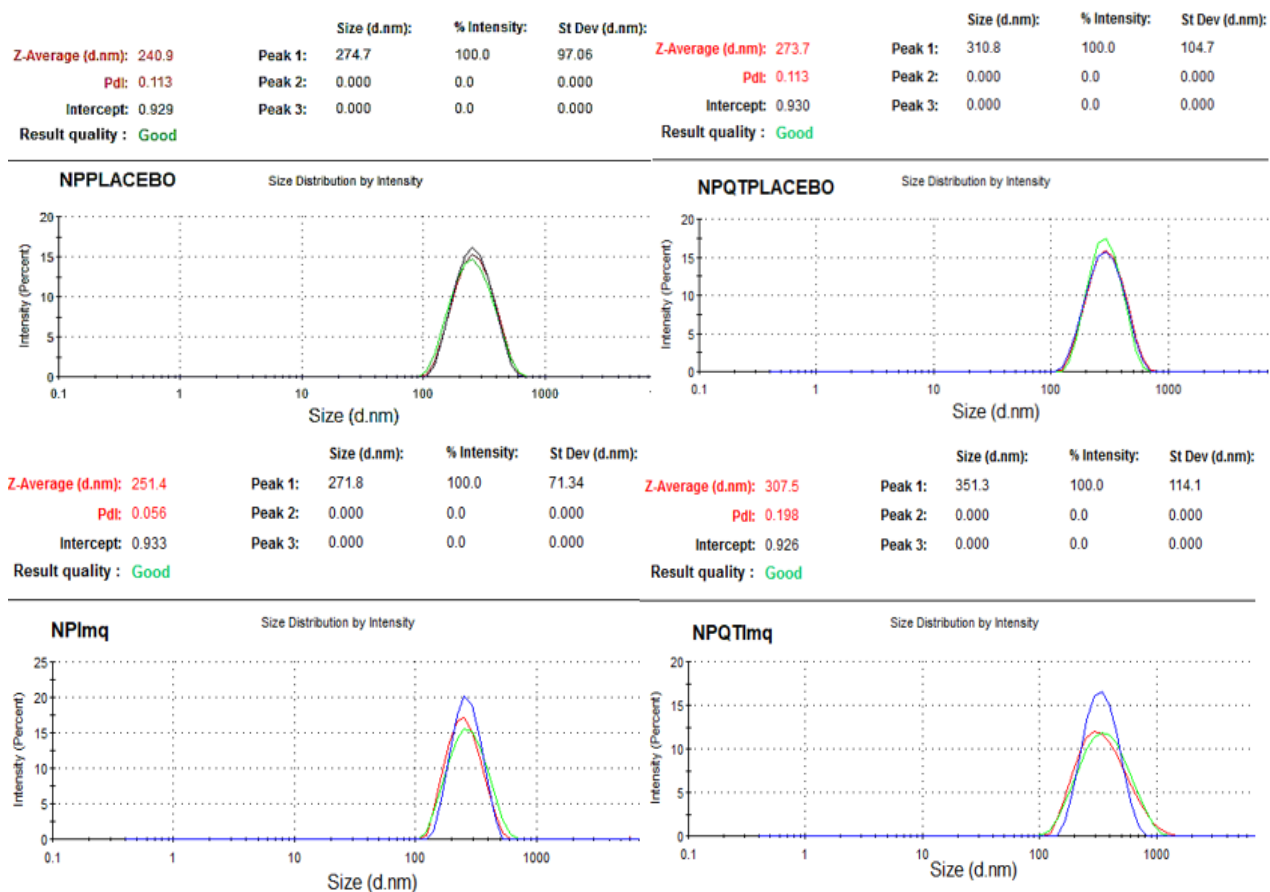
| Tempo (dias) | NPPlacebo         |            | NPQTPlacebo        |            | NPImq              |            | NPQTImq          |            |
|--------------|-------------------|------------|--------------------|------------|--------------------|------------|------------------|------------|
|              | Diâmetro (nm± DP) | IP±DP      | Diâmetro (nm ± DP) | IP±DP      | Diâmetro (nm ± DP) | IP±DP      | Diâmetro (nm±DP) | IP±DP      |
| 0            | 230,2±10,9        | 0,101±0,01 | 264,3±9,5          | 0,162±0,04 | 249,3±12,6         | 0,123±0,06 | 287,0±22,4       | 0,184±0,01 |
| 7            | 226,2±7,5         | 0,091±0,02 | 250,7±5,1          | 0,108±0,03 | 245,4±14,5         | 0,117±0,03 | 287,2±27,9       | 0,173±0,03 |
| 14           | 225,0±10,3        | 0,103±0,04 | 260,8±9,4          | 0,163±0,02 | 250,0±15,4         | 0,104±0,01 | 288,6±26,9       | 0,191±0,03 |
| 21           | 226,2±11,2        | 0,137±0,01 | 261,7±6,4          | 0,181±0,02 | 248,1±14,4         | 0,115±0,01 | 283,6±30,8       | 0,154±0,03 |
| 28           | 222,4±11,8        | 0,144±0,0  | 256,8±4,6          | 0,170±0,04 | 242,5±12,2         | 0,08±0,03  | 286,1±30,3       | 0,135±0,05 |
| 35           | 226,7±15,1        | 0,109±0,1  | 260,3±7,6          | 0,147±0,04 | 247,1±13,8         | 0,09±0,05  | 290,8±26,6       | 0,161±0,03 |
| p valor      | 0,2209            | 0,2168     | 0,9866             | 0,606      | 0,403              | 0,0831     | 0,6508           | 0,1266     |

\* Valores que apresentam diferença estatisticamente significativa considerados para  $p < 0,05$ .

DP = desvio-padrão; n = 3; NPPlacebo = nanocápsula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanocápsula polimérica placebo revestida com quitosana; NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

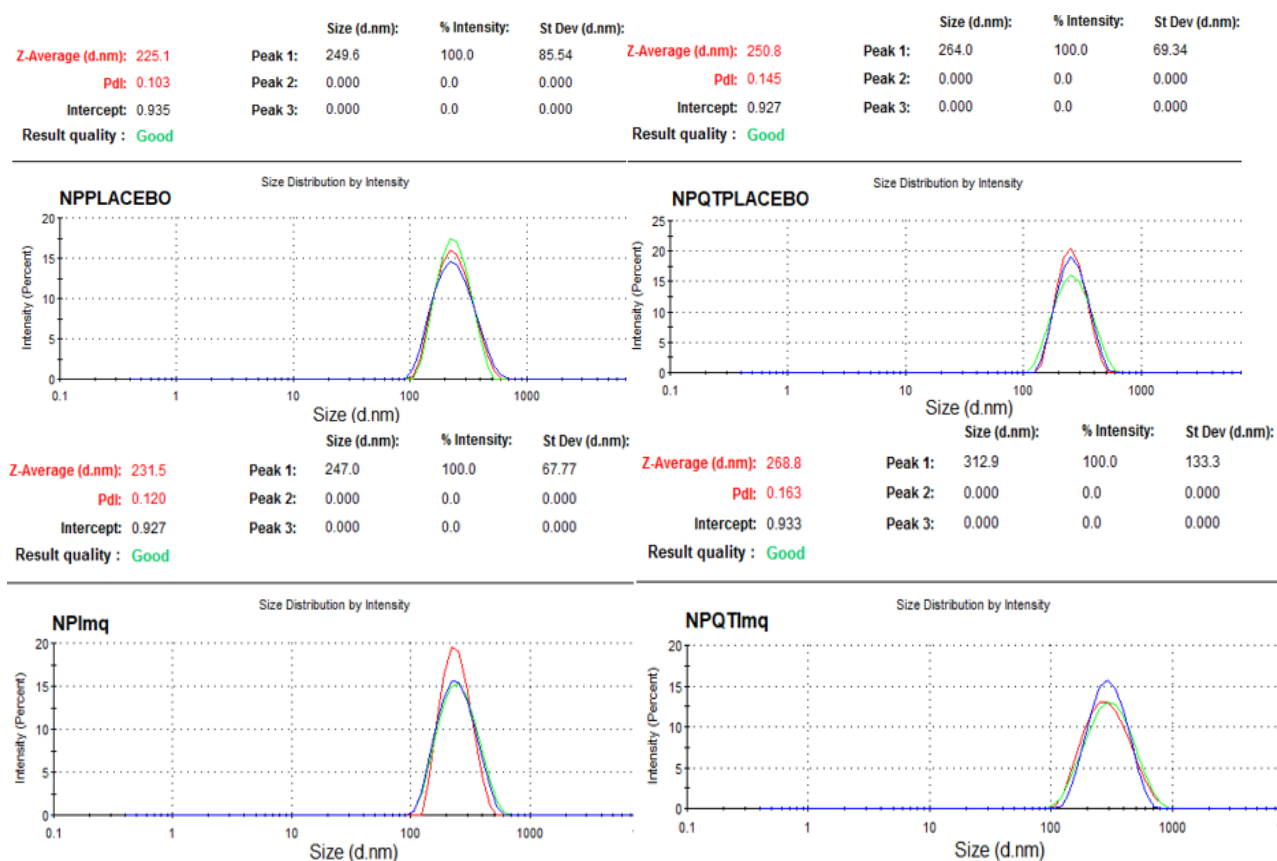
**Figura 25 –** Curvas de distribuição de tamanho das formulações desenvolvidas após preparo.



NPPlacebo = nanocápsula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanocápsula polimérica placebo revestida com quitosana; NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

**Figura 26** – Curvas de distribuição de tamanho das formulações desenvolvidas 35 dias após preparo.



NPPlacebo = nanocápsula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanocápsula polimérica placebo revestida com quitosana; NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

Durante o período avaliado não ocorreram variações estatisticamente significativas em ambos parâmetros, diâmetro e índice de polidispersão das formulações, o que poderia ser atribuído a ausência dos fenômenos citados ao longo de 35 dias. Além disso, o valor do IP em todas as medições foi inferior à 0,2 o que sugere distribuição unimodal e homogênea das nanocápsulas (WU et al., 2011).

Observou-se também que o revestimento com quitosana resultou aumento do tamanho médio das partículas quando comparadas às não revestidas o que pode estar associado a adsorção do polímero catiônico à superfície das nanocápsulas de eudragit® L100, carregadas negativamente. Resultado semelhante foi encontrado em estudos realizados anteriormente: em estudo realizado por Varshosaz et al. (2014), nanopartículas de poli[(etileno)-co-(acetato de vinila)] contendo carvedilol foram revestidas com diferentes concentrações de quitosana (0,2, 0,4 e 0,6% p/v) diluída em ácido acético 2% (v/v). Nesse estudo foi observado aumento do diâmetro das partículas revestidas comparadas às formulações sem revestimento (VARSHOSAZ et al., 2014).

Resultado similar também foi encontrado em nanolipossomas contendo alfacipermetrina e etofenprox. Ao avaliar o efeito do revestimento de quitosana no tamanho dessas nanopartículas foi observado aumento estatisticamente significativo do diâmetro dos nanocarreadores revestidos em comparação aos sem revestimento (BANG et al., 2011).

Em outro trabalho, o revestimento de quitosana (0,25% p/v) em nanocápsulas de policaprolactona ou de ciclodextrina também promoveu o aumento do tamanho de ambas partículas. Esse resultado foi atribuído à adsorção das moléculas de quitosana ao redor da superfície das nanocápsulas desenvolvidas (ÜNAL et al., 2015).

### **5.2.8 Potencial zeta**

Os valores de potencial zeta medidos após preparo e em 7, 14, 21, 28 e 35 dias de todas as formulações estão apresentados na Tabela 7. As Figuras 27 e 28 representam os gráficos dos valores de potencial zeta no dia de preparo e 35 dias após preparo. Nenhuma das amostras apresentou variação estatisticamente significativa no valor desse parâmetro no período avaliado. As nanopartículas não revestidas, tanto a placebo como a que possui o fármaco incorporado, apresentaram potencial zeta negativo o que seria esperado devido a presença de grupos carboxílicos expostos nas extremidades da cadeia polimérica do eudragit® L100 (CETIM et al., 2010). Entretanto, a incorporação do Imq a esse sistema resultou na redução do valor do potencial zeta, o que poderia ser atribuído à adsorção do fármaco ao polímero.

**Tabela 7** – Potencial zeta das dispersões de nanopartículas 35 dias após preparo.

| Tempo (dias) | NPPlacebo               | NPQTPlacebo             | NPImq                   | NPQTImq                 |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|              | Potencial zeta $\pm$ DP | Potencial Zeta $\pm$ DP | Potencial Zeta $\pm$ DP | Potencial Zeta $\pm$ DP |
| 0            | -28,5 $\pm$ 1,8         | +13,6 $\pm$ 1,8         | -40,1 $\pm$ 3,7         | +11,3 $\pm$ 0,5         |
| 7            | -28,7 $\pm$ 0,7         | +14,8 $\pm$ 0,6         | -34,7 $\pm$ 0,6         | +10,1 $\pm$ 0,4         |
| 14           | -26,3 $\pm$ 1,9         | +15,2 $\pm$ 1,0         | -39,9 $\pm$ 2,0         | +10,5 $\pm$ 0,5         |
| 21           | -29,4 $\pm$ 0,3         | +11,8 $\pm$ 0,3         | -41,3 $\pm$ 4,4         | +10,5 $\pm$ 0,0         |
| 28           | -27,0 $\pm$ 2,8         | +14,0 $\pm$ 1,5         | -34,8 $\pm$ 4,5         | +11,4 $\pm$ 0,5         |
| 35           | -27,3 $\pm$ 2,6         | +13,4 $\pm$ 1,0         | -34,6 $\pm$ 1,8         | +11,2 $\pm$ 1,1         |
| Pvalor       | 0,4900                  | 0,5648                  | 0,3881                  | 0,5734                  |

\* Valores que apresentam diferença estatisticamente significativa considerados para  $p < 0,05$ .

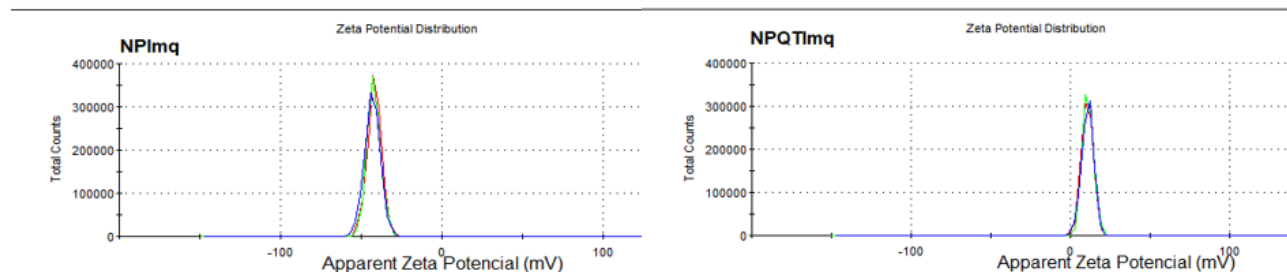
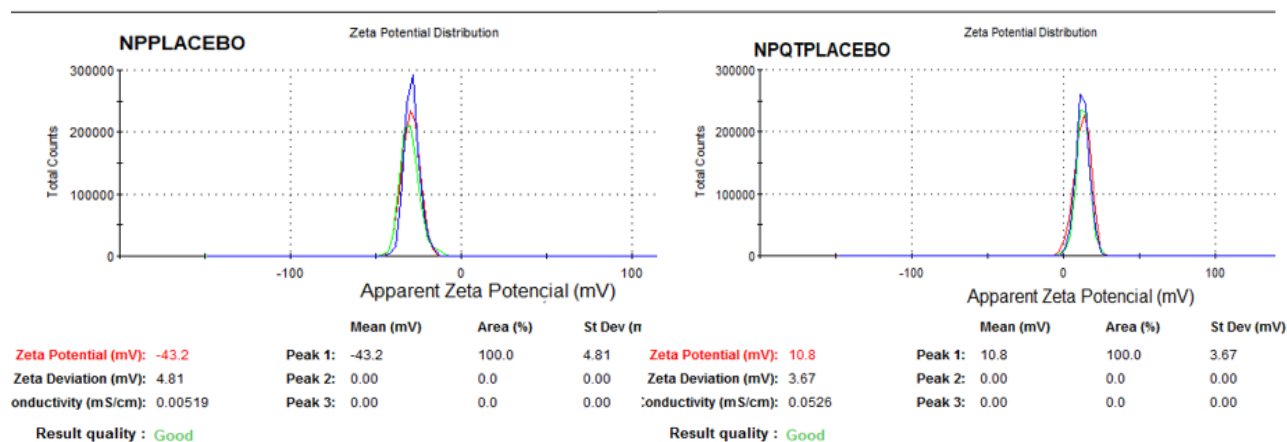
DP = desvio-padrão; n = 3; NPPlacebo = nanopartícula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanopartícula polimérica placebo revestida com QT; NPImq = nanopartícula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanopartícula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

As nanopartículas revestidas com quitosana apresentaram potencial zeta positivo o que pode estar associado ao excesso de grupos -NH<sub>2</sub> protonados na quitosana em comparação com os grupos -COOH desprotonados do eudragit® L100 (CALIJA et al., 2015), o que sugere que as partículas foram efetivamente revestidas. A interação entre esses dois polímeros, eudragit® L100 e quitosana, pode ter ocorrido espontaneamente por meio de interações iônicas entre as cargas opostas de ambos, formando compostos polieletrólíticos, já descritos em estudos prévios (van der GUCHT et al., 2011; CALIJA et al., 2015).

**Figura 27 – Potencial zeta das dispersões de nanopartículas após o preparo.**

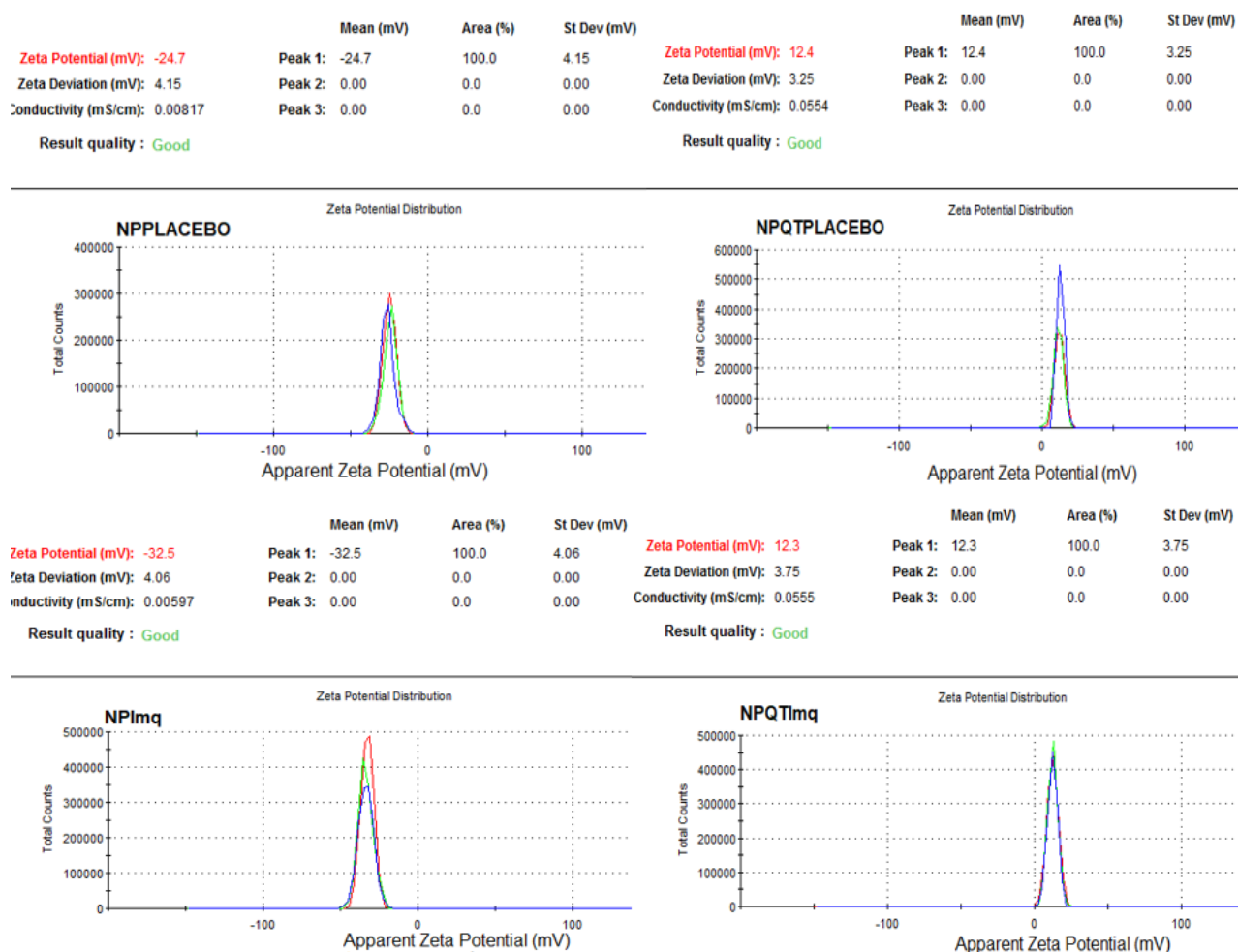
|                              | Mean (mV)     | Area (%) | St Dev |                              | Mean (mV)    | Area (%) | St Dev (mV) |
|------------------------------|---------------|----------|--------|------------------------------|--------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): -28.8   | Peak 1: -28.8 | 100.0    | 4.40   | Zeta Potential (mV): 12.5    | Peak 1: 12.5 | 100.0    | 5.34        |
| Zeta Deviation (mV): 4.40    | Peak 2: 0.00  | 0.0      | 0.00   | Zeta Deviation (mV): 5.34    | Peak 2: 0.00 | 0.0      | 0.00        |
| Conductivity (mS/cm): 0.0213 | Peak 3: 0.00  | 0.0      | 0.00   | Conductivity (mS/cm): 0.0622 | Peak 3: 0.00 | 0.0      | 0.00        |
| Result quality : <b>Good</b> |               |          |        | Result quality : <b>Good</b> |              |          |             |



NPPlacebo = nanocápsula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanocápsula polimérica placebo revestida com quitosana; NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

**Figura 28** – Potencial zeta das dispersões de nanopartículas 35 dias após o preparo.



NPPlacebo = nanocápsula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanocápsula polimérica placebo revestida com quitosana; NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

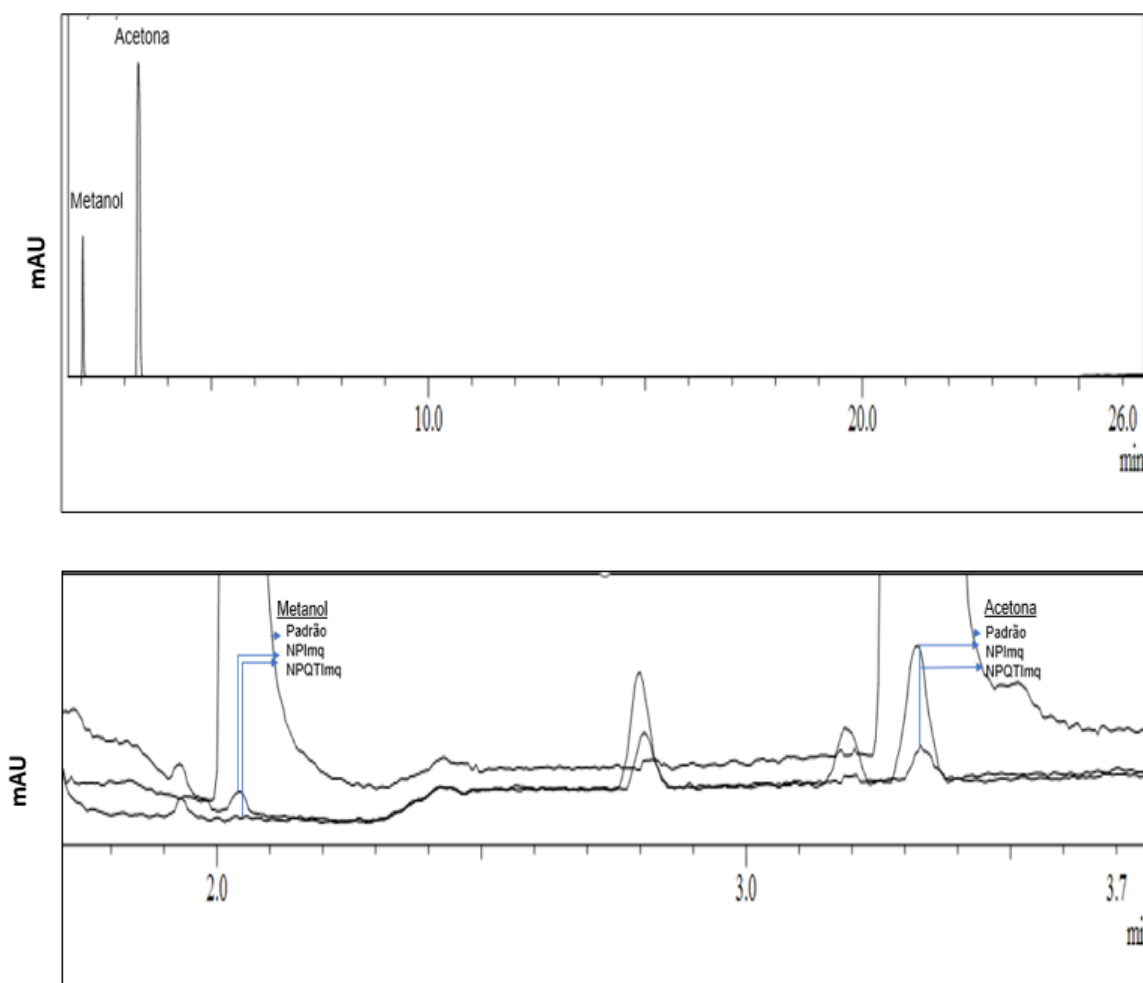
Fonte: dados da pesquisa.

### 5.2.9 Solvente residual

Os cromatogramas obtidos na análise do padrão de 5.000 ppm de acetona e de 3.000 ppm de metanol bem como das formulações de NP estão representados na Figura 29 e as respectivas áreas dos picos estão indicadas na Tabela 8.

A acetona e o metanol foram identificados nos cromatogramas de acordo com o tempo de retenção associado a cada solvente no banco de dados do equipamento. O metanol apresentou um tempo de retenção médio de 2,040 min enquanto para a acetona esse tempo foi de 3,319 minutos.

**Figura 29** – Cromatogramas obtidos na análise por cromatografia gasosa do padrão de 5.000 ppm de acetona e 3.000 ppm de metanol e das formulações de nanopartículas desenvolvidas.



Fonte: dados da pesquisa.

**Tabela 8** – Áreas obtidas na análise por cromatografia gasosa do padrão de 5.000 ppm de acetona e 3.000 ppm de metanol e das formulações de nanopartículas desenvolvidas

|                | Metanol (mAU) | Acetona (mAU) |
|----------------|---------------|---------------|
| Solução-padrão | 11011517      | 7114818       |
| NPImq          | 3968          | 2181          |
| NPQTImq        | -             | -             |

Fonte: dados da pesquisa.

Ao comparar as áreas dos picos das soluções padrão de metanol e acetona com às áreas desses solventes nas amostras, observa-se que para a NPImq o valor é significativamente inferior aos limites estabelecidos pelo guia de segurança utilizado como referência e para NPQTImq os cromatogramas se aproximam da linha de base nos tempos de retenção dos solventes analisados não sendo possível, nesse caso, quantificar as áreas dos picos.

Desse modo, pode-se inferir que os resíduos de acetona e metanol, utilizados no preparo das formulações, estão bem abaixo das especificações de segurança preconizadas (Guia para solventes residuais do *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH., 2016).

#### **5.2.10 Eficiência de encapsulação**

A eficiência de encapsulação das nanocápsulas foi de  $92,5\% \pm 0,4$  para as NPImq e  $88,6\% \pm 2,3$ , para NPQImq.

A menor eficiência de encapsulação, observada para NP revestidas com quitosana, quando comparada à dispersão coloidal sem revestimento pode ser associada ao pH mais ácido dessa formulação devido ao uso de ácido acético diluído utilizado para solubilizar a quitosana. Em pH ácido o Imq pode tornar-se mais solúvel uma vez que o composto é considerado uma base fraca (TELÒ et al., 2016), o que poderia modificar a partição do fármaco na formulação.

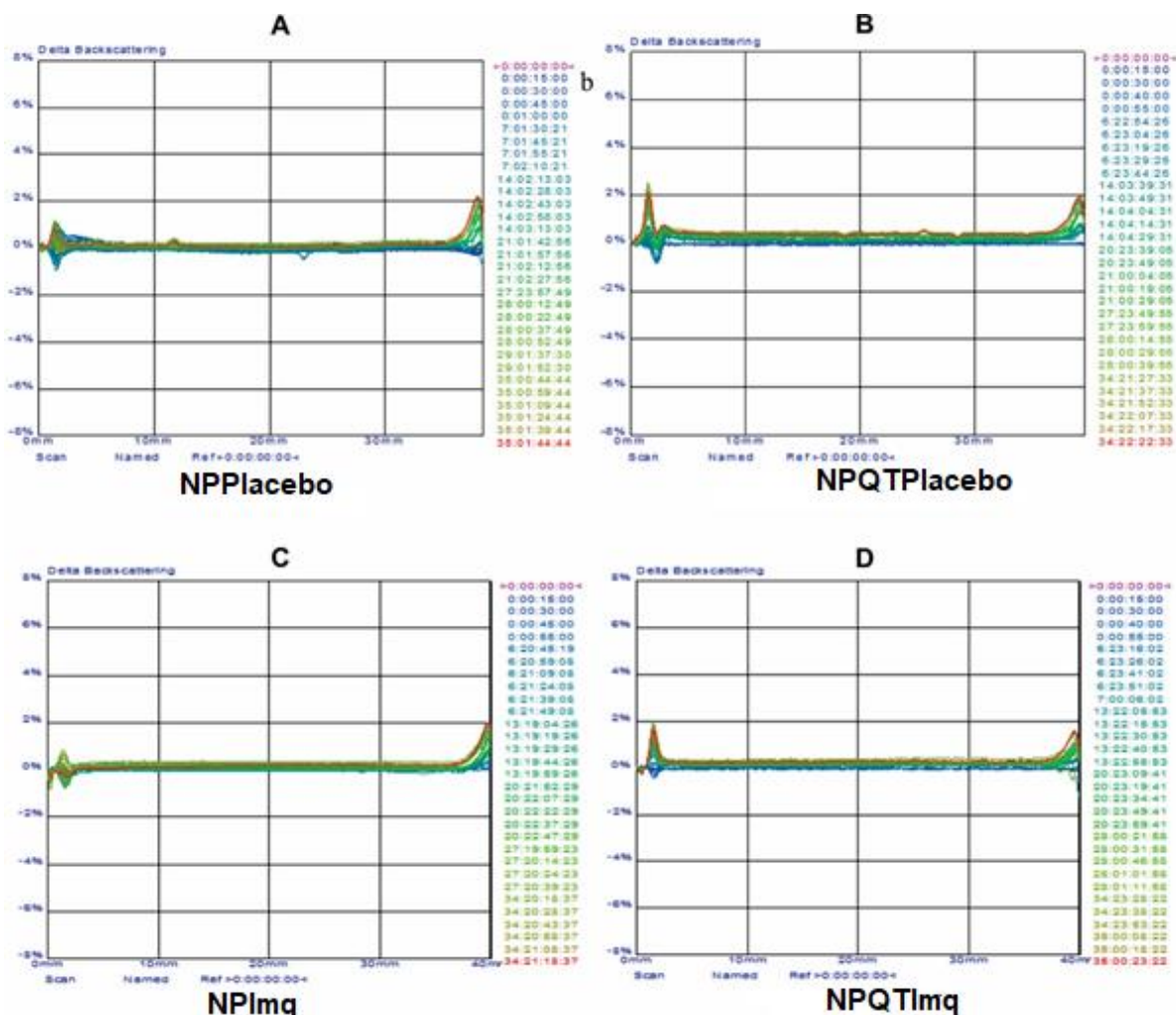
#### **5.2.11 Caracterização ótica por espalhamento múltiplo de luz**

Os gráficos obtidos das análises de caracterização ótica por espalhamento múltiplo da luz estão apresentadas na Figura 30. Variações de  $\Delta$  *Backscattering* na base da cubeta (a altura da cubeta está indicada no eixo das abcissas), representam fenômenos de sedimentação, alterações no topo da célula de análise determinam fenômeno de cremagem e mudanças no meio do espectro estão relacionadas à modificação do tamanho das nanopartículas que podem ocorrer devido à coalescência ou à floculação (PANDO et al., 2013).

Todas as amostras exibiram variação positiva no gráfico de  $\Delta$  *Backscattering*, observada como picos ascendentes, tanto na base, como no topo da cubeta. Esse perfil indica que houve um discreto aumento da concentração de partículas na base e no topo na célula contendo a amostra ao longo das 5 semanas de análise. No meio da célula, os espectros ( $\Delta$ BS) apresentaram elevada sobreposição, com uma variação inferior à 2%, indicando que não ocorreram mudanças significativas no tamanho das partículas o que corrobora com as análises de tamanho realizadas durante o mesmo intervalo de tempo (OLEJNIK et al., 2015). Nenhuma das variações detectadas foi

superior a 10%, o que sugere que não ocorreram processos de desestabilização irreversíveis e que foram obtidas formulações estáveis (PANDO et al., 2013).

**Figura 30** – Perfis de retroespalhamento das formulações de NP analisadas pelo equipamento Turbiscan Lab®, no período de até 35 dias após o preparo.



Fonte: dados da pesquisa.

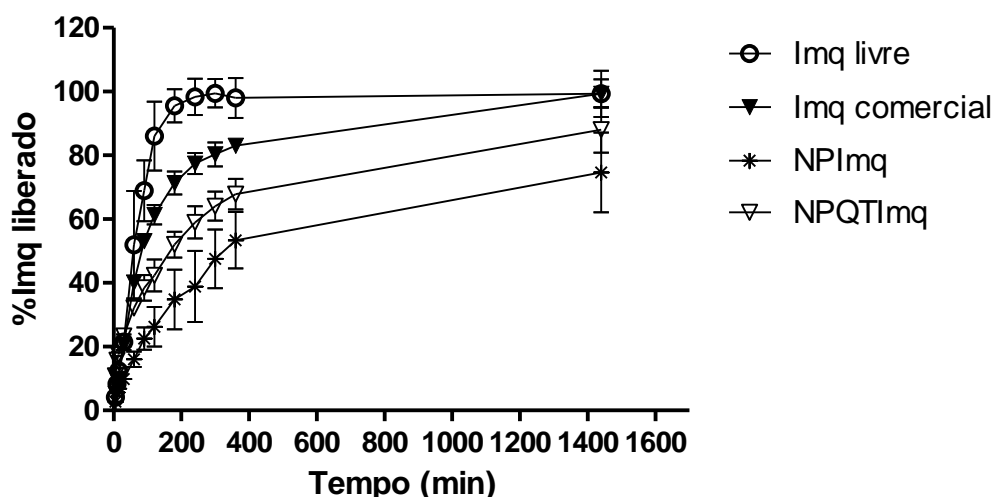
### 5.2.12 Estudo de liberação *in vitro*

Os estudos de solubilidade necessários para definição das condições de realização do estudo de liberação *in vitro* mostraram que a solubilidade do Imq em tampão acetato pH 5,6, similar ao pH da superfície cutânea, foi de 42,1 µg/mL. Esse resultado foi considerado para que a manutenção da condição *sink* do sistema fosse mantida durante todo o ensaio.

O perfil de liberação do Imq a partir das NP está representado na Figura 31. Nos primeiros 15 minutos do início do estudo, tanto a NPImq quanto NPQTImq não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) na liberação do Imq

comparada à curva do fármaco em solução. Esse resultado pode ser atribuído tanto à fração de fármaco não encapsulado, livre no meio dispersante, quanto à presença de Imq adsorvido na superfície das partículas e liberado mais rapidamente.

**Figura 31** – Perfis de liberação *in vitro* do Imq em solução, Imq comercial, NPImq e NPQTImq.



n = 3; NPPlacebo = nanopartícula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanopartícula polimérica placebo revestida com quitosana; NPImq = nanopartícula polimérica contendo Imq; e NPQTImq = nanopartícula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

A rápida liberação inicial de substâncias carregadas por meio de NP também foi observada em estudos anteriores e foi atribuída a adsorção do ativo na superfície dos sistemas (CETIM et al., 2010; EL-NAHAS et al., 2017) ou às moléculas de fármaco encapsuladas próximas a superfície do nanocarreador (CETIM et al., 2010).

A liberação do Imq pelas NP revestidas e não revestidas também foi mais lenta ( $p < 0,05$ ) do que a liberação da molécula no produto comercializado a partir do tempo de 60 minutos do início do estudo, indicando que tais formulações apresentaram maior controle na liberação do ativo. O Imq em solução foi completamente liberado em 180 minutos, a formulação comercial, em 300 minutos apresentou 80% de liberação do fármaco enquanto, nesse mesmo tempo, a NPImq e NPQTImq exibiram 56 e 64%, respectivamente, de liberação.

Em trabalho anterior utilizando nanopartículas de PLGA e eudragit® L100 em diferentes razões, a liberação do ativo carregado (diclofenaco de sódio) foi associada ao intumescimento e erosão do polímero de metacrilato em tampão pH 6,8, utilizado como meio receptor. Esses processos, diretamente relacionados à velocidade de

liberação do fármaco, ocorreriam em virtude da desprotonação dos grupamentos de ácido carboxílico no eudragit® L100 em pH específico. A ionização desses grupamentos ocasionaria repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas do eudragit® L100 levando ao intumescimento, à erosão do polímero e, conseqüentemente, à liberação do fármaco (CETIN et al., 2010).

No presente estudo o pH do meio receptor foi de 5,6, próximo ao pH de dissolução do eudragit® L100, pH 6, sugerindo que o intumescimento e erosão do polímero através dos mecanismos citados poderiam resultar no perfil de liberação encontrado para o Imq.

Para NPQTImq observou-se liberação mais rápida que NPIImq ( $p < 0,05$ ), o que poderia ser ocasionado pela menor eficiência de encapsulação da NP revestida. A maior quantidade de fármaco no meio dispersante promoveria, desse modo, a difusão inicial mais rápida do ativo através da membrana de diálise.

### 5.3 CONCLUSÃO

O Imq foi encapsulado em NP poliméricas de eudragit® L100, com e sem revestimento de quitosana, preparadas pelo método de precipitação do polímero pré-formado. Os estudos de caracterização realizados mostraram que não foram detectadas estruturas cristalinas nas formulações NPIImq e NPQTImq pela difratometria de raios X, sugerindo dispersão completa do fármaco na matriz polimérica e núcleo oleoso das partículas. Foram detectadas interações entre a quitosana e os demais componentes da formulação por meio das análises de DSC e IV, sendo estas possivelmente de caráter eletrostático. O tamanho das partículas dentro da escala nanométrica foi confirmado pela técnica de espalhamento dinâmico da luz e pelas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

As formulações desenvolvidas contendo o fármaco, NPIImq e NPQTImq, não apresentaram alterações estatisticamente significativas de pH, tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta além de ausência fenômenos de instabilidade durante o período de 35 dias. No ensaio de liberação *in vitro* as dispersões NPIImq e NPQTImq tiveram o fármaco liberado no meio receptor no intervalo de 24 horas, enquanto o fármaco em solução foi liberado em 3 horas sugerindo potencial das nanocápsulas desenvolvidas para uso em sistemas de liberação sustentada do Imq.

## 6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO IMIQUIMODE

---

### 6.1. MATERIAL E MÉTODOS

#### 6.1.1 Material

Ovos da espécie *Gallus domesticus*, imiquimode (Glenmark Generic LTD, Índia), copolímero de polimetacrilato, massa molecular 125.000 g/mol (eudragit® L100, Evonik, Brasil), quitosana de baixa massa molecular 50.000-190.000 g/mol (Sigma Aldrich, Brasil), miristato de isopropila (Sigma Aldrich, Brasil), triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (Polytechno, Brasil), triolato de sorbitano (Span® 85, Sigma Aldrich, Brasil), copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (Poloxamer 407, BASF, Alemanha), polissorbato 80 (Merck, Alemanha), creme de imiquimode comercial (Modik, Germed, Brasil).

#### 6.1.2 Equipamentos

Incubadora de ovos de galinha, estereomicroscópio (Olympus; EUA), sistema de purificação de água RiOs® (Millipore, EUA), balança analítica (Sartorius, Alemanha), zetasizer nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra).

#### 6.1.3 Método

##### 6.1.3.1 Atividade antiangiogênica em membrana corioalantoica (CAM) de ovo de galinha

A atividade antiangiogênica das formulações das NP desenvolvidas foi avaliada por ensaio em membrana corioalantoica de embriões de galinha da espécie *Gallus domesticus*.

No dia de chegada dos ovos ao laboratório, correspondente ao terceiro dia de desenvolvimento embrionário, foi aberto um orifício de cerca de 1,5 cm de diâmetro na casca de todos os ovos. Em seguida, a membrana da casca foi retirada cuidadosamente e a abertura foi coberta com fita adesiva transparente. Os ovos foram mantidos em incubadora à 37 °C (Figura 32).

**Figura 32** – Representação esquemática do ensaio em CAM.



Fonte: dados da pesquisa.

Após 48 horas de incubação, ou quinto dia de desenvolvimento embrionário, aplicou-se sobre a membrana corioalantoica, 20  $\mu\text{L}$  das formulações a serem testadas: NPplacebo, NPQTplacebo, NPImq (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), NPQTImq (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Como controle positivo utilizou-se o creme de Imq comercial na mesma concentração das formulações desenvolvidas (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para a diluição do produto comercial, disponível na concentração de 5mg de Imq por grama de creme, 200mg do Imq comercial foram pesados e diluídos em 40 mL de água purificada atingindo a concentração final de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A emulsão comercial óleo em água obtida foi homogeneizada em agitador magnético durante 30 minutos à 100rpm. Como controle negativo foi utilizada uma solução de PBS, pH 7,4. Para cada grupo foi utilizado um  $n = 12$ . O local de aplicação foi demarcado com um disco de papel de filtro esterilizado de 0,5 cm de diâmetro e os ovos foram novamente cobertos com fita adesiva e incubados por mais 48 horas (até o sétimo dia de desenvolvimento embrionário) (Figura 32).

No sétimo dia de desenvolvimento embrionário ou quinto dia de incubação, as membranas corioalantoicas de todos os ovos foram retiradas e fotografadas com auxílio de um microscópio estereoscópico conectado a um sistema de câmera. A quantificação dos vasos foi realizada através do programa Image J.

As membranas tratadas com PBS, creme de Imq comercial diluído, NPImq e NPQTIImq foram fixadas em formaldeído a 10%, emblocadas em parafina, cortadas a 5 µm e coradas em soluções de hematoxilina e eosina. Nas lâminas obtidas avaliou-se a presença e, ou, ausência de vasos sanguíneos.

Com o objetivo de verificar a estabilidade das NP em pH próximo ao pH dos ovos (entre 7 e 7,6) (REIJRINK et al., 2008; RÊGO et al., 2012), 1 mL das formulações NPImq e NPQTIImq foi diluído em PBS pH 7,4 na razão 1:10. Nos tempos 0 e 48 horas (período em que a formulação fica em contato com a membrana corioalantoica), o diâmetro médio das formulações diluídas foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons. Foi avaliada também a variação do potencial zeta da dispersão NPQTIImq a medida que o pH do meio dispersante se torna básico através da titulação pH versus potencial zeta dessa formulação utilizando uma solução de NaOH na concentração de 0,2mol/L como titulante.

#### 6.1.3.2 Análise estatística

Para avaliar a relação entre os dados dos grupos testados, utilizou-se o teste estatístico de Tukey (Análise de variância – ANOVA). O valor de *p* foi considerado significativo quando menor que 0,05.

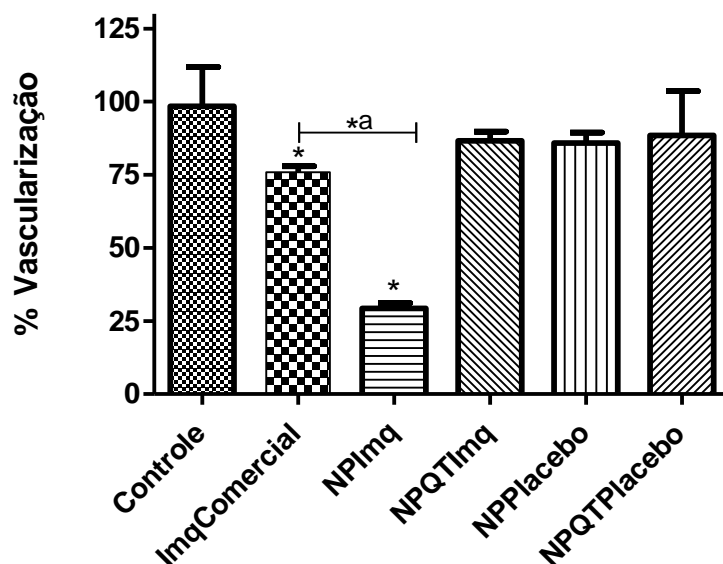
## 6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao percentual de vasos para cada grupo testado estão indicados na Figura 33. Tanto a formulação comercial diluída como a NPImq reduziram significativamente a proporção de vasos sanguíneos da CAM em relação ao grupo controle. As NP contendo Imq levaram à diminuição de 70,6% dos vasos da membrana, sendo também a única dispersão que apresentou efeito antiangiogênico superior ao obtido pela formulação comercial, de cerca de 24,2%. A NPPlacebo não apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo controle, sugerindo que a redução de vasos verificada no grupo NPImq ocorreu devido apenas à presença do fármaco.

A ação antiangiogênica do Imq ocorre devido a indução de citocinas antiangiogênicas como a IL-12, que atua na redução da produção celular de fatores proangiogênicos como bFGF e VEGF, inibe a motilidade e invasão vascular (LI et al., 2005), e induz a apoptose de células endoteliais (LI et al., 2005; KUZNETSOVA et al., 2012;

TREMAINE et al., 2012). Estes mecanismos poderiam explicar os resultados obtidos nos grupos tratados com Imq Comercial e NPImq.

**Figura 33** – Percentual de vascularização em ensaio de CAM para Imq comercial diluído e formulações desenvolvidas.



\* Valores que apresentam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; \*a = valores que apresentam diferença estatisticamente significativa em relação ao Imq comercial; n=12; NPPlacebo = nanopartícula polimérica placebo; NPQTPlacebo = nanopartícula polimérica placebo revestida com quitosana; NPImq = nanopartícula polimérica contendo Imq; e NPQImq = nanopartícula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

A veiculação do Imq em NP não revestidas proporcionou um aumento de cerca de três vezes do efeito inibidor de formação de vasos em relação ao Imq comercial, sugerindo que esse sistema possa ter promovido maior internalização do fármaco nas células e camadas da CAM e conseqüentemente, maior efeito antiangiogênico. O aumento da captação celular/tecidual de fármacos pouco solúveis veiculados através de nanopartículas é relatado na literatura, sendo atribuído principalmente à elevada relação área/superfície desse tipo de partícula, capaz de melhorar a adsorção e controlar a dissolução desses compostos (LAI et al., 2016).

Outros estudos também relatam o aumento da atividade antiangiogênica de alguns fármacos quando encapsulados em nanocarreadores. Nanoesferas poliméricas carreando paclitaxel e endostatina apresentaram maior efeito antiproliferativo em células endoteliais do cordão umbilical humano, comparado ao mesmo efeito desses fármacos em sua forma livre. Esse resultado foi associado à redução de reações de oxidação e degradação enzimática promovida pela encapsulação dos ativos em nanocarreadores e a sua liberação sustentada (HAMMADY et al., 2009).

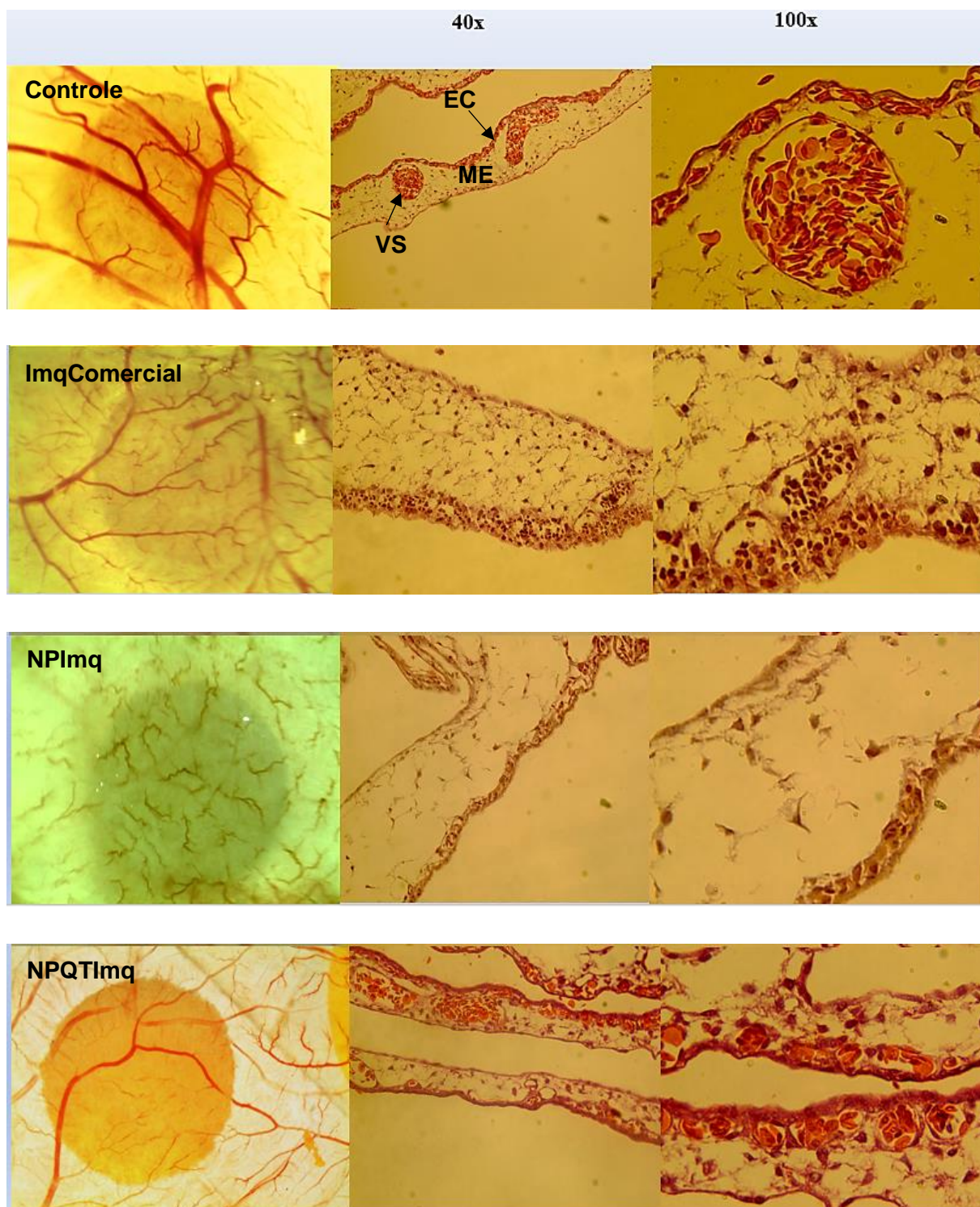
Nanopartículas contendo magnolol, composto isolado da *Magnolia officinalis*, e com propriedades antioxidantes e antiproliferativas, demonstraram melhor eficiência de captação em células musculares lisas vasculares comparada a sua forma livre. Esses dados foram atribuídos a liberação controlada do ativo através da parede polimérica das nanopartículas que funcionou como barreira à liberação do magnolol, o que não ocorreu com o fármaco livre, rapidamente metabolizado (WANG et al., 2011).

Este efeito também é confirmado nas imagens representativas dos grupos tratados e controle obtidas por estereomicroscopia (Figura 34). No grupo controle, observa-se ampla vascularização da CAM com presença de vasos de grande calibre na imagem obtida pelo estereomicroscópio. Esse resultado corrobora com as imagens histológicas em aumentos de 40 e 100x, nas quais se notam vasos calibrosos na mesoderme (ME) e microvasos logo abaixo da ectoderme (EC). No grupo tratado com Imq comercial ainda é possível observar a presença de macro e microvasos, porém em menor quantidade. No grupo NPImq, macrovasos estão ausentes, mas ainda se observam vasos sanguíneos de pequeno calibre.

Para o grupo tratado com NPQTIImq não foi observada diferença no percentual de vascularização estatisticamente significativa em relação aos grupos placebo e controle (Figura 33). Na Figura 34 também é possível observar vasos sanguíneos de grande e pequeno calibre por toda membrana em grupo tratado com NP contendo Imq revestida com quitosana, confirmando ausência de efeito dessa formulação na angionênese durante o período em que o ensaio foi realizado.

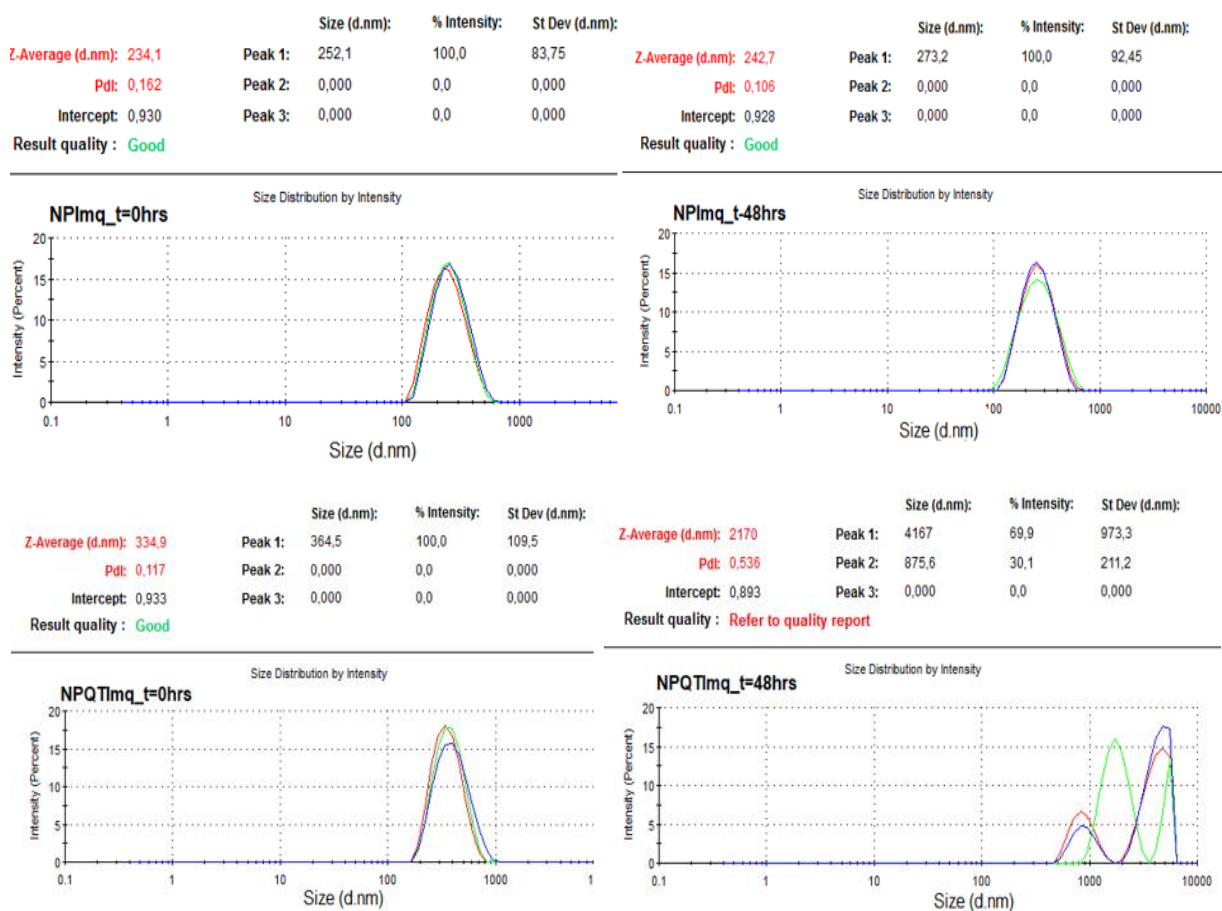
Nas análises de diâmetro hidrodinâmico das formulações NPImq e NPQTIImq diluídas em tampão pH 7,4 (Figura 35), condição semelhante ao ensaio em CAM, nota-se que a distribuição do tamanho das nanocápsulas NPImq matêm-se em escala nanométrica e com índice de polidispersão inferior a 0,2 em 0 e 48 horas após diluição sugerindo que nesse período as NP mantiveram-se estáveis em pH 7,4. É possível observar também que o diâmetro médio das nanocápsulas NPImq aumenta de 234,1 para 242,7 nm no intervalo de 48 horas.

**Figura 34** – Análise histopatológica de CAM (40 e 100X) [EC (Ectoderme) ME (Mesoderme) VS (vaso sanguíneo)].



Fonte: dados da pesquisa.

**Figura 35** – Curvas de distribuição de tamanho das formulações NPImq e NPQTIImq 0 e 48 horas após diluição em tampão pH 7,4.



NPImq = nanocápsula polimérica contendo Imq; e NPQTIImq = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

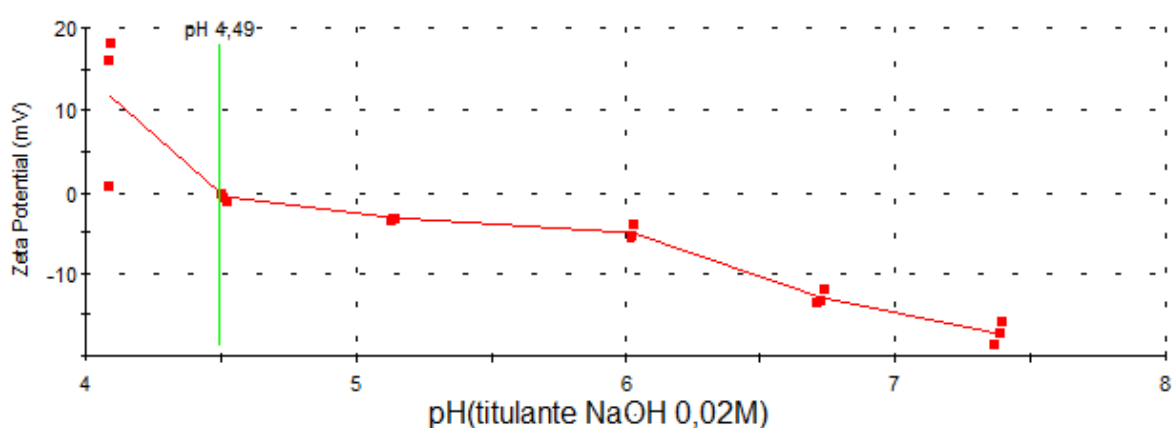
Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados por SAHLE e colaboradores em 2017 que demonstram que NP de eudragit® L100 contendo dexametasona não dissolveram ou erodiram em pH 7,5 (superior ao pH 6 de dissolução do eudragit® L100), apenas intumesceram. O intumescimento da matriz polimérica pôde ser observado pelo aumento de tamanho das NP por espectroscopia de correlação de fótons (SAHLE et al., 2017), resultado também obtido no presente estudo.

Para NPQTIImq observa-se que em 48 horas as partículas têm aumento do diâmetro hidrodinâmico após diluição em tampão pH 7,4, condição do ensaio em CAM, com presença de partículas micrométricas, e índice de polidispersão superior à 0,5. Este resultado sugere que nesse pH, as NP revestidas se agregam formando sistemas não nanométricos. O aumento do diâmetro de NPQTIImq nessas condições sugere que durante o ensaio em CAM a formulação não se manteve estável formando

sistemas distintos de NP o que poderia modificar a internalização do Imq veiculado por esse sistema. Estes dados são similares aos resultados obtidos em estudo realizado por Hussain et al. (2013) que avaliaram a estabilidade de NP de quitosana na faixa de pH entre 3 e 7, sendo observado que em pH 7, assim como no presente estudo, ocorreu aumento expressivo no diâmetro das partículas testadas, o que foi atribuído à aglomeração das mesmas.

A agregação das partículas nesse pH pode ter ocorrido devido a desprotonação dos grupamentos ionizáveis, carregados positivamente, da quitosana a medida que o pH do meio se modifica de ácido para básico levando assim à diminuição do potencial repulsivo da superfície entre as partículas e sua conseqüente aglomeração (LÓPEZ-LEÓN et al., 2005; HUSSAIN et al., 2013). Essa hipótese foi confirmada através da análise simultânea de pH e potencial zeta da formulação NPQTI<sub>m</sub>q (pH em torno de 4) a medida que foram adicionados volumes conhecidos de solução de NaOH à 0,02 mol/L (Figura 36). Foi observado que a medida que o pH da dispersão foi se tornando mais básico o módulo do potencial zeta reduziu, chegando ao seu ponto isoelétrico, ou seja, de inversão de carga superficial positiva para negativa em pH 4,49. Esse resultado corrobora com a hipótese de que em meio dispersante básico a formulação NPQTI<sub>m</sub>q provavelmente se torna instável devido a diminuição de forças repulsivas de caráter eletrostático.

**Figura 36** – Curva de titulação pH vs Potencial Zeta da formulação NPQTI<sub>m</sub>q



NPQTI<sub>m</sub>q = nanocápsula polimérica contendo Imq revestida com quitosana.

Fonte: dados da pesquisa.

### **6.3 CONCLUSÃO**

A formulação de NP de Imq não revestidas com quitosana apresentou atividade antiangiogênica superior ao Imq comercial em modelo de membrana corialantoica de embrião de galinha. Este resultado indica potencial da formulação desenvolvida para o tratamento de doenças causadoras de angiogênese. Contudo, as NP revestidas com quitosana não apresentaram atividade significativa na redução de formação de vasos sanguíneos no período de tempo do ensaio.

## **7 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA E DA ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA DAS NANOPARTÍCULAS DESENVOLVIDAS EM MODELO MURINO DE CARCINOGENESE QUÍMICA**

---

### **7.1 MATERIAL**

Imiquimode (Glenmark Generic LTD, Índia), copolímero de polimetacrilato, massa molecular 125.000 g/mol (eudragit® L100, Evonik, Brasil), quitosana de baixa massa molecular 50.000-190.000 g/mol (Sigma Aldrich, Brasil), miristato de isopropila (Sigma Aldrich, Brasil), triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (Polytechno, Brasil), triolato de sorbitano (Span® 85, Sigma Aldrich, Brasil), copolímero de polioxi-etileno-polioxipropileno (Poloxamer 407, BASF, Alemanha), polissorbatato 80 (Merck, Alemanha), creme de imiquimode comercial (Modik, Germed, Brasil), (7,12-dimetilbenz(a)antraceno) DMBA (Sigma Aldrich, Brasil), óleo de cróton (Sigma Aldrich, Brasil), acetona (Synth, Brasil), álcool PA (Synth, Brasil), formaldeído (Synth, Brasil), parafina (Paraplast®, Sigma Aldrich, Brasil), hematoxilina (Sigma Aldrich, Brasil), eosina (Sigma Aldrich, Brasil), fita adesiva (Scotch 3M, Brasil), micropipeta 200 µL (Gilson, EUA), paquímetro digital (Digimess, Brasil).

Camundongos Swiss machos saudáveis, com peso entre 20 e 25g, foram fornecidos pelo biotério da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FUNED (CEUA), nº do protocolo: 108/2016 (ANEXO A).

### **7.2 EQUIPAMENTOS**

Agitador magnético (Nova Ética, Brasil), microscópio óptico (Olympus, EUA), micrótomo (Olympus cut 4025, EUA), sistema de purificação de água RiOs® (Millipore, EUA), banho de ultrassom (Elma, Alemanha), cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent, EUA).

## **7.3 MÉTODOS**

### **7.3.1 Permeação cutânea de formulações contendo Imq**

Os camundongos foram randomicamente divididos em três grupos (n = 8) A, B e C e a pele dorsal de todos os animais foi depilada (3 × 3 cm<sup>2</sup>) usando um aparador de pêlos 48 horas antes do início do experimento. O tratamento realizado nos grupos se deu da seguinte forma:

Os animais do grupo A receberam topicamente 200µL de NPImq três vezes por semana durante 16 semanas consecutivas;

Os animais do grupo B receberam topicamente 200µL de NPQTImq três vezes por semana durante 16 semanas consecutivas;

Os animais do grupo C receberam topicamente 200µL de Imq comercial diluído três vezes por semana durante 16 semanas consecutivas.

Após eutanásia, os animais dos grupos A, B e C tiveram o estrato córneo da área dorsal removido pela técnica de remoção de fita. Para esse procedimento 20 fitas adesivas foram cortadas em 2 cm x 2 cm, aderidas consecutivamente na região dorsal de cada animal e removidas rapidamente (PRAÇA et al., 2018).

Após a extração do estrato córneo, foram removidos fragmentos da pele dorsal de todos os animais e a epiderme foi separada da derme. Para este procedimento, os fragmentos da pele foram imersos em água ultrapura a 60 ° C durante 45 segundos e a epiderme foi separada da derme usando um bisturi cirúrgico (VENTURINI et al., 2015). A epiderme e a derme foram cortadas e colocadas em diferentes frascos contendo acetonitrila e metanol (1: 1) e mantidas em banho de ultrassom durante 30 minutos para extração do Imq. Após este tempo, os conteúdos dos tubos foram filtrados (em filtros de 0,45 µm) para vials e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando método previamente descrito.

### **7.3.2 Ação quimiopreventiva de formulações contendo Imq**

Os animais foram randomicamente divididos em sete grupos (n = 8) e a pele dorsal de todos os camundongos foi depilada (3 × 3 cm<sup>2</sup>) usando um aparador de

pêlos 48 horas antes do início do experimento. O tratamento realizado nos grupos I à VII, esquematizado na Figura 37, se deu da seguinte forma:

Os animais do grupo I receberam topicamente 200µL de acetona três vezes por semana durante 16 semanas consecutivas servindo como controle negativo;

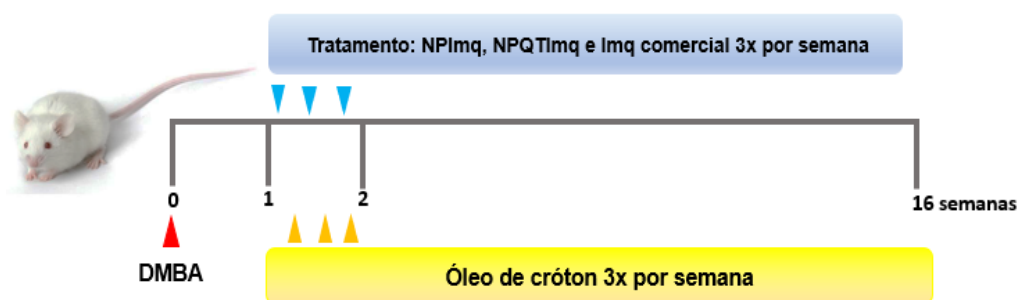
Os animais do grupo II receberam dose única do iniciador tumoral DMBA (100µg dissolvido em 200 µL de acetona) sobre a área de pele raspada. Uma semana após iniciação com DMBA aplicou-se sobre o dorso dos animais 200 µL do óleo de cróton 1% dissolvido em acetona (200 µL). Esse procedimento foi realizado três vezes por semana durante 16 semanas consecutivas sendo esse grupo considerado o controle cancerígeno.

Os animais dos grupos III e IV: receberam dose única do iniciador tumoral DMBA (100 µg dissolvido em 200 µL de acetona) sobre a área de pele depilada. Uma semana após iniciação com DMBA aplicou-se sobre o dorso dos animais 200 µL das formulações NPPlacebo (Grupo III) e NPQTPlacebo (Grupo IV) 2 horas antes da aplicação do óleo de cróton 1% dissolvido em acetona (200 µL). Esse procedimento foi realizado três vezes por semana durante 16 semanas consecutivas.

Os animais dos grupos V, VI e VII: receberam dose única do iniciador tumoral DMBA (100 µg dissolvido em 200 µL de acetona) assim como os grupos III e IV. Uma semana após iniciação com DMBA aplicou-se sobre o dorso dos animais 200 µL das formulações NPImq (Grupo V), NPQTImq (Grupo VI) e Imq comercial (Grupo VII) 2 horas antes da aplicação do óleo de cróton 1% dissolvido em acetona (200 µL). Esse procedimento foi realizado três vezes por semana durante 16 semanas consecutivas sendo esses grupos comparados ao controle tumoral e entre si afim de avaliar a atividade quimiopreventiva das formulações contendo Imq.

Os grupos II ao VII tiveram registrados semanalmente, o número e diâmetro dos tumores acima de 1mm presentes na superfície dorsal (ABEL et al., 2009; NIRMALA; NARENDHIRAKANNAN., 2017). Os parâmetros estudados após a conclusão do estudo (16 semanas) foram: o número e diâmetro médio dos tumores, determinado através de paquímetro calibrado, por grupo experimental

**Figura 37** – Representação esquemática da indução tumoral realizada.



Fonte: dados da pesquisa.

Após eutanásia dos animais dos grupos I a VII, a pele dorsal foi removida e fixada em formol 10% por 24 horas. Em seguida realizou-se a desidratação das amostras de tecido cutâneo em álcool 70, 80, 90 e 100% durante 2 horas em cada concentração. Após desidratadas as amostras de pele foram emblocadas em parafina, cortadas a 5  $\mu\text{m}$  e coradas com soluções de hematoxilina e eosina. Nos cortes histológicos obtidos avaliou-se alterações como hiperqueratose (aumento da espessura do estrato córneo), hiperplasia (aumento da espessura da epiderme), presença de infiltrado inflamatório e de pérolas córneas.

### **7.3.2 Análise estatística**

Para avaliar a relação entre os dados dos grupos testados, utilizou-se o teste estatístico de Tukey (Análise de variância – ANOVA) e o teste t não pareado. O valor de  $p$  foi considerado significativo quando menor que 0,05.

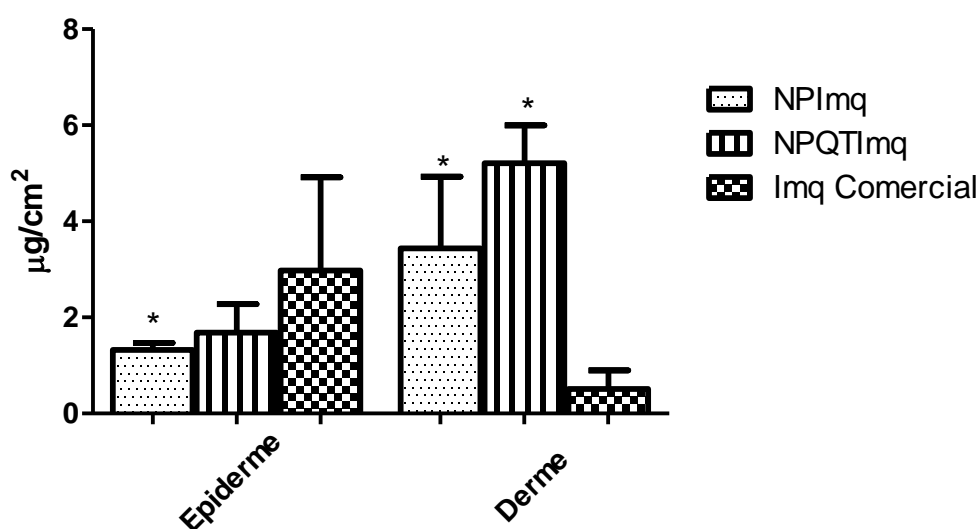
## **7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **7.4.1 Permeação cutânea de formulações contendo Imq**

A concentração de Imq retido na epiderme e na derme em diferentes formulações está representada na Figura 38. É possível observar que as dispersões aquosas, NPImq e NPQTImq, obtiveram maior concentração do fármaco na derme do que na epiderme enquanto o Imq comercial apresentou efeito contrário, com maior retenção do Imq na epiderme em relação a derme. Esse resultado indica que o encapsulamento do Imq em nanocarreadores poliméricos foi capaz de promover a permeação e retenção do fármaco em camadas mais profundas da pele. Tal efeito pode ser vantajoso na terapia com Imq uma vez que seu principal mecanismo de ação

ocorre por meio da ativação de células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, presentes na derme (MICALI et al., 2014). A permeação das NP nessas camadas possivelmente ocorreu através dos folículos pilosos que permitem o acúmulo desses nanocarreadores nas aberturas foliculares, criando um sistema reservatório e liberando o fármaco lentamente (KOLENYAK DOS SANTOS et al., 2013; BALZUS et al., 2017).

**Figura 38** – Permeação cutânea de formulações contendo Imq



Cada coluna representa a média  $\pm$ DP; n = 8 (\* p < 0,05 versus Imq comercial/Grupo C)  
 Fonte: dados da pesquisa.

A modificação da biodistribuição de fármacos quando carregados por NP poliméricas é descrita na literatura sendo atribuída principalmente ao aumento da biodisponibilidade, área superficial e controle da liberação da substância terapêutica promovida por esses sistemas (FRANK et al., 2015).

Devido ao maior controle da liberação da NPImq em relação à NPQTImq, observada *in vitro* no presente trabalho, esperou-se que a NPImq obtivesse maior retenção do fármaco nas camadas viáveis da pele do que NPQTImq. No entanto, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre as duas formulações no estudo *in vivo*. Esse resultado poderia ser explicado pelo fato de que no ensaio *in vitro* não são consideradas as possíveis interações das NP com o tecido cutâneo.

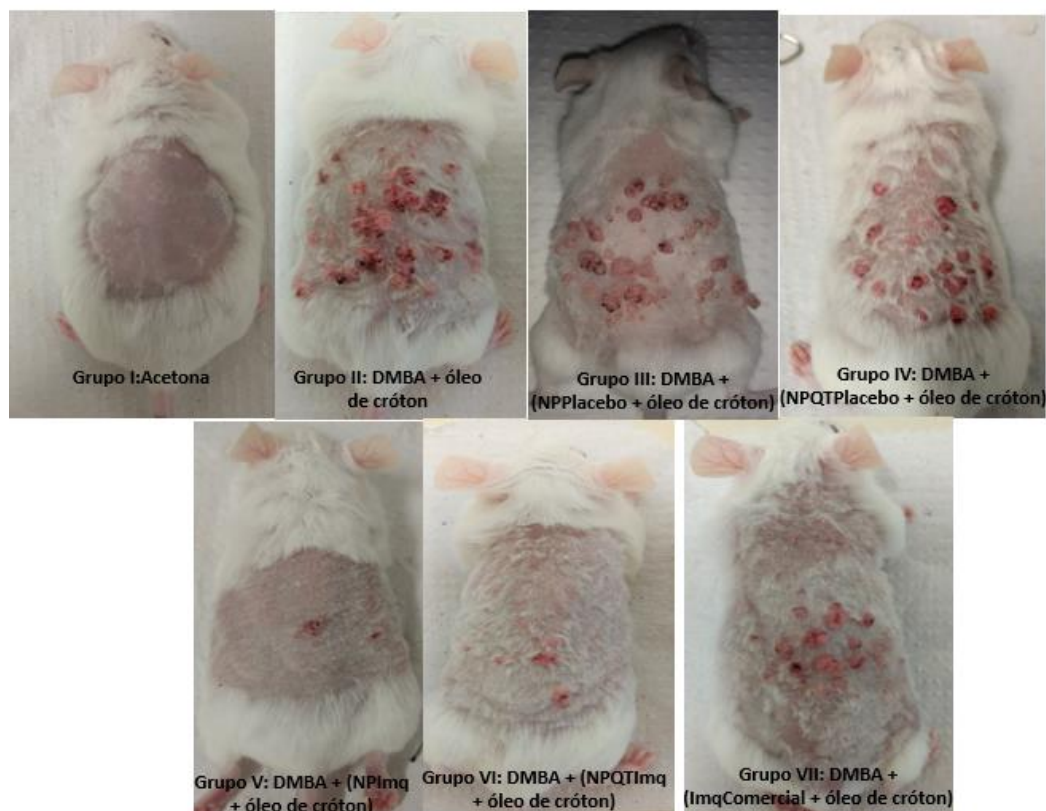
A quitosana, utilizada como polímero de revestimento em NPQTImq, é comumente descrita como um potencializador da permeação cutânea. Esse efeito se deve a sua carga positiva em meios moderadamente ácidos que promove maior adesão às membranas biológicas, negativamente carregadas (GOYAL et al., 2016).

Essa propriedade poderia explicar a permeação cutânea da dispersão NPQTImq não diferir de NPImq, embora apresente liberação mais rápida no estudo *in vitro*.

#### **7.4.2 Ação quimiopreventiva de formulações contendo Imq**

Os resultados referentes ao número e diâmetro médio dos tumores ao final do experimento estão indicados nas Figuras 40 e 41. A imagem representativa da pele dorsal dos camundongos (Figura 39) referente ao grupo controle negativo (Grupo I), tratado apenas com acetona, mostra ausência de lesões tumorais aparentes enquanto o grupo controle cancerígeno (Grupo II) e os grupos tratados com formulações placebo (III e IV) apresentaram múltiplos papilomas confirmando que a indução do processo de carcinogênese química através do modelo DMBA/óleo de cróton não foi alterada com a aplicação das formulações placebo. Esse resultado também é verificado quanto ao número final de papilomas ao final do experimento (Figura 40) uma vez que não ocorreram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos II, III e IV. Nota-se também redução na multiplicidade de tumores dos grupos tratados com NPImq (Grupo V), NPQTImq (Grupo VI) e Imq comercial (Grupo VII), comparativamente aos grupos II, III e IV (Figura 39).

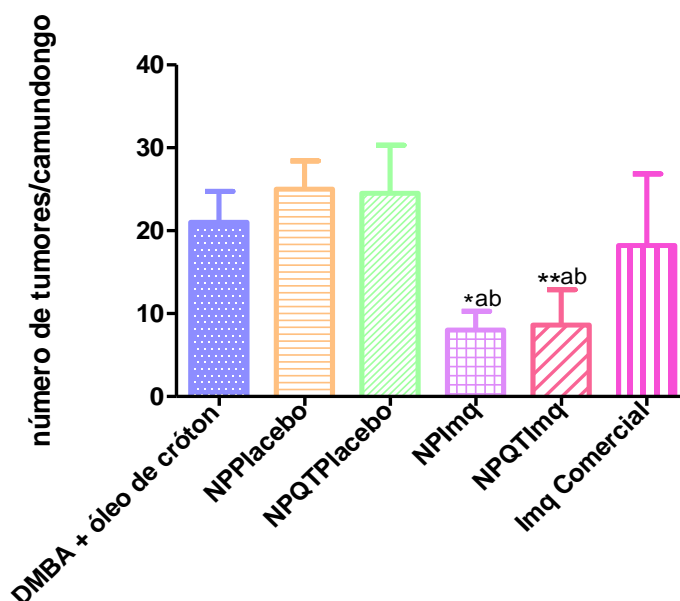
**Figura 39** – Imagem representativa dos grupos experimentais do estudo *in vivo*.



Fonte: dados da pesquisa.

Esse resultado pode ser confirmado pela análise do número médio de tumores por grupo ao final do experimento (Figura 40). Nos grupos V e VI, tratados com NPImq e NPQTImq, a média do número de tumores por camundongo foi de  $8,00 \pm 2,27$  e  $8,60 \pm 4,28$ , respectivamente, sendo inferior ( $p < 0,05$ ) tanto à média de papilomas nos respectivos grupos tratados com NPPlacebo, de  $25,00 \pm 3,41$  (Grupo III) e NPQTPlacebo, de  $24,50 \pm 5$  (Grupo IV), quanto ao número médio de tumores no grupo II ou controle cancerígeno, de  $21,00 \pm 3,74$ . Ambas NP contendo Imq obtiveram, ainda, maior efeito quimiopreventivo em relação aos animais tratados com Imq comercial que apresentaram  $18,22 \pm 8,64$  de papilomas por animal ao final do estudo. O grupo em que foi aplicado o Imq comercial também não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle cancerígeno, apesar de obter menor média de papilomas. Este resultado sugere alta variabilidade na resposta anti-tumoral obtida pelo tratamento comercial na concentração de  $250 \mu\text{g/mL}$  do Imq, a mesma utilizada nas formulações de NP.

**Figura 40** – Número médio de tumores por camundongo referente as formulações testadas.



Cada coluna representa a média  $\pm$ DP; n = 8 (\*  $p < 0,05$  versus NPPlacebo/Grupo III,  $p^{**} < 0,05$  versus NPQTPlacebo/ Grupo IV, "a"  $p < 0,05$  versus Im comercial/ Grupo VII e "b"  $p < 0,05$  versus DMBA + óleo de cróton/ Grupo II)

Fonte: dados da pesquisa.

A atividade antitumoral das formulações de NP contendo Imq no processo de carcinogênese pôde ser observada também a partir da distribuição do diâmetro dos papilomas (Figura 41). NPImq e NPQTImq promoveram redução estatisticamente significativa no número médio de papilomas em todas as faixas de diâmetro. Nota-se

também que para tumores entre 3 e 4 mm de diâmetro, ambas formulações de NP apresentaram menor média de papilomas ( $p < 0,05$ ) em relação a formulação comercial.

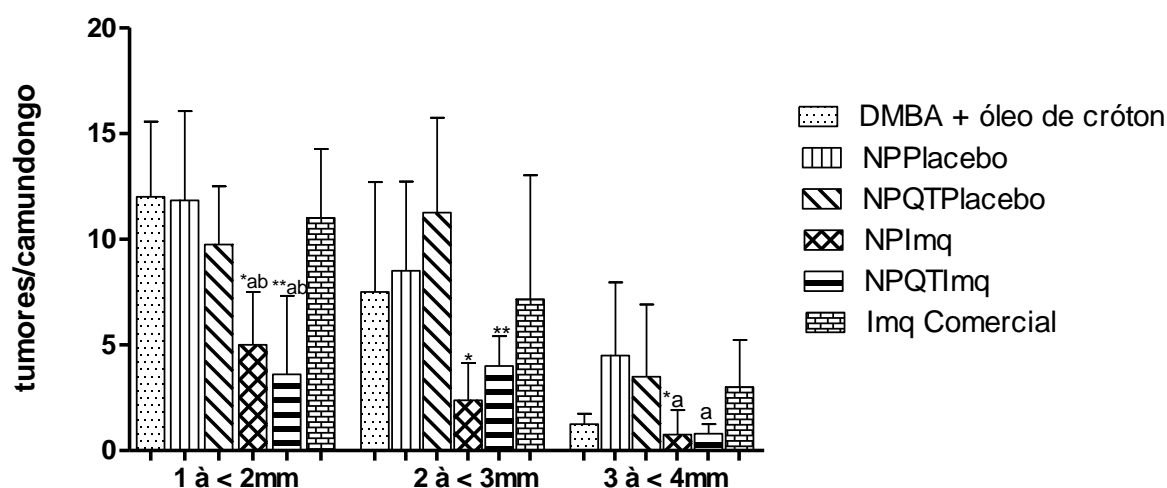
O efeito quimiopreventivo superior das NP contendo Imq comparativamente ao Imq comercial pode ser devido a uma combinação do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) dos nanocarreadores nos papilomas (PRABHU et al., 2015; KHAN, 2017; NIRMALA; NARENDHIRAKANNAN., 2017), à atividade antiangiogênica, à liberação mais lenta do fármaco pelas nanocápsulas e à maior retenção do Imq nas camadas viáveis da pele promovida pelas NP.

Quando os tumores atingem cerca de 2 mm, novos vasos são desenvolvidos para garantir nutrientes e fornecimento de oxigênio ao tecido tumoral. Esses vasos se formam de maneira desorganizada e com fenestrações que variam de 100 nm a 2  $\mu$ m (PRABHU et al., 2015), permitindo que as NP atinjam a vasculatura tumoral através dessas lacunas endoteliais e liberem o medicamento no local alvo. Por outro lado os tecidos sadios possuem lacunas bem menores (de 15 a 30 nm), inviabilizando o acúmulo de NP de maior diâmetro nesses locais.

Como as NP apresentam liberação mais lenta do fármaco, também podem formar um sistema de reservatório além de reduzir sua degradação, levando a um aumento da sua biodisponibilidade, como demonstrado no estudo de permeação cutânea realizado no presente trabalho. A liberação sustentada também está associada à redução de efeitos colaterais (REHMAN; ZULFAKAR., 2017), o que pode ser confirmado nas análises histopatológicas.

O grupo I (Figura 42) apresentou estrutura padrão da pele, com as camadas epiderme e derme bem delimitadas e sem a presença de infiltrado inflamatório. Já os grupos de controle tumoral e tratados com NP placebo (II, III e VI) revelaram hiperplasia epidermal (aumento da espessura da epiderme), hiperkeratose (aumento da espessura da camada córnea) infiltrado inflamatório abundante, invasão de células da epiderme na derme, e formação de pérolas córneas (células escamosas queratinizadas), causadas pela aplicação de óleo cróton e do DMBA (EL-NAHAS; ALLAM; ABEL et al., 2017).

**Figura 41** – Distribuição do diâmetro dos tumores por grupo experimental.



Cada coluna representa a média  $\pm$ DP; n = 8 (\* p < 0,05 versus NPPlacebo/ Grupo III, p \*\* < 0,05 versus NPQTPlacebo/ Grupo IV, "a" p < 0,05 versus Imq comercial/ Grupo VII e "b" p < 0,05 versus DMBA + óleo de cróton/ Grupo II)

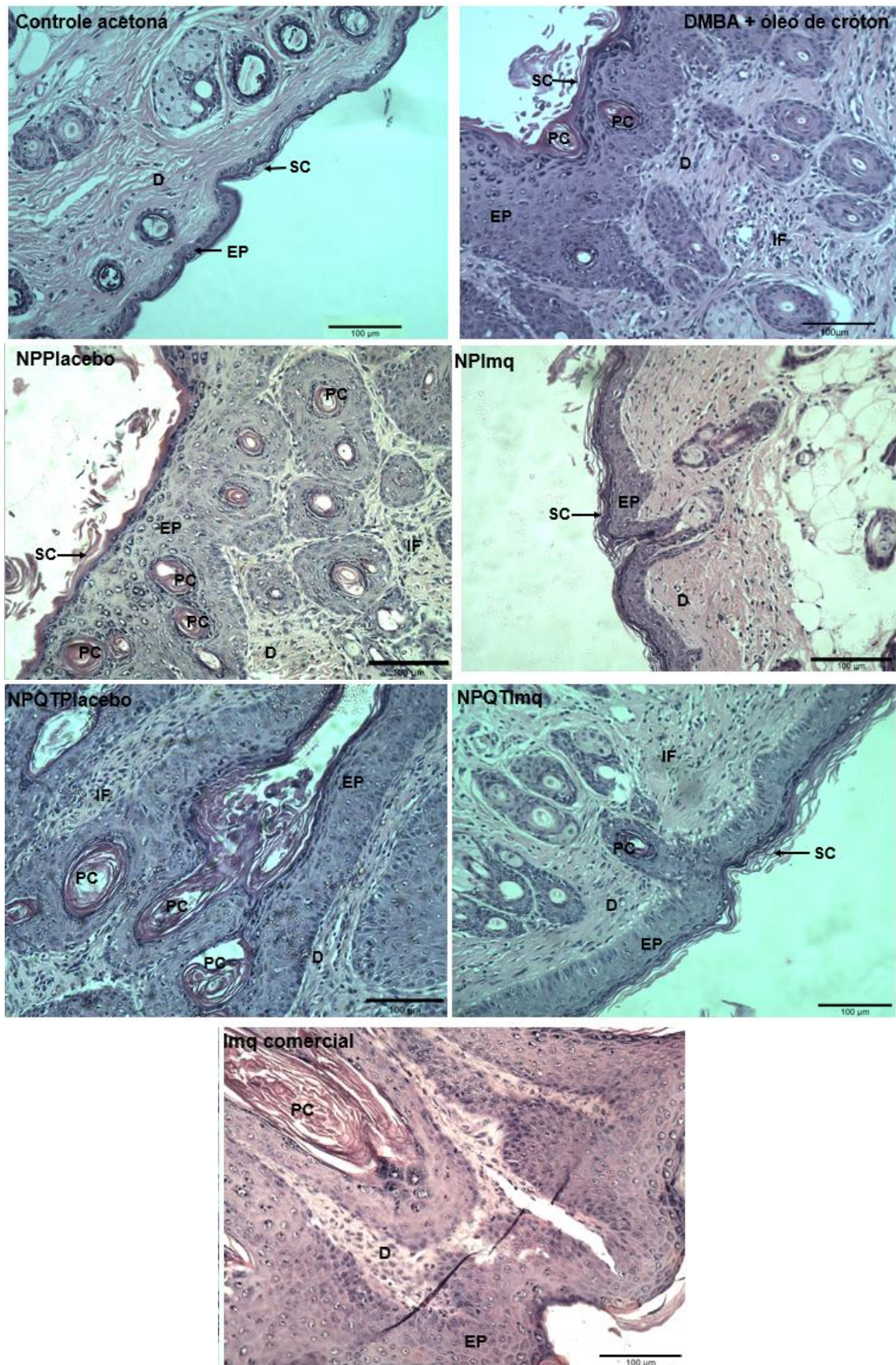
Fonte: dados da pesquisa.

Os grupos tratados com NPImq e NPQTImq (V e VI) apresentaram camadas da pele (epiderme e derme) mais bem delimitadas e com espessura epidermal inferior aos grupos II, III e IV e ao grupo tratado com Imq comercial (Grupo VII). No entanto, ainda é possível observar nos grupos V e VI presença de infiltrado de células inflamatórias e pérolas córneas, embora em menor proporção que nos grupos II, III e VI, além de maior espessura epidermal em relação ao grupo I. Este resultado confirma que a ação quimiopreventiva do Imq ocorreu de uma forma dependente da formulação em que foi veiculado, uma vez que as formulações de NP na mesma concentração que a formulação comercial diluída apresentaram eficácia superior a esta.

Resultados similares foram descritos por Rehman e Zulfakar (2017). Neste trabalho, também foi avaliado o potencial quimiopreventivo de um sistema coloidal bigel de óleo de peixe contendo Imq em modelo murino de câncer de pele. Esse sistema levou à redução das alterações histopatológicas, controle do crescimento tumoral e inibição significativa de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) em comparação com o grupo de controle cancerígeno. No entanto, o sistema bigel foi aplicado diariamente sobre a pele dorsal dos animais na concentração de 5 mg de Imq por grama de formulação. No presente estudo, utilizou-se uma concentração 20 vezes inferior do fármaco e as formulações foram aplicadas apenas três vezes por semana, sugerindo eficácia do sistema desenvolvido mesmo em baixas concentrações e menor frequência de aplicação.

Uma vez que o número final de papilomas pode ser considerado um parâmetro para se avaliar a iniciação tumoral e o crescimento desses tumores é um indicador da expansão clonal das células “iniciadas”, este resultado sugere que as NP contendo Imq com e sem revestimento foram capazes de inibir ou reverter parcialmente tanto a etapa de iniciação como a fase de promoção tumoral no estudo realizado (KEMP, 2005).

**Figura 42** – Análise histopatológica de pele de camundongo (aumento de 20x) [EP (Epiderme) D (Derme) SC (estrato córneo) PC (pérola córnea) IF (infiltrado inflamatório)].



Fonte: dados da pesquisa.

## 9 CONCLUSÕES

Foi possível obter nanopartículas estáveis com cerca de 90% de eficiência de encapsulação do Imq e liberação prolongada do fármaco comparativamente às formas livre e comercial.

Os dados obtidos no ensaio de atividade antiangiogênica, permeação cutânea e no modelo de carcinogênese química utilizado demonstraram que a encapsulação do Imq em nanocarreadores promoveu aumento significativo da eficácia tanto na inibição da formação de novos vasos sanguíneos como na ação quimiopreventiva do fármaco além da permeação cutânea em camadas profundas da pele.

Como perspectiva desse trabalho, as nanocápsulas desenvolvidas poderiam ser incorporadas em veículos de aplicação tópica como géis e cremes e realizados outros estudos pré-clínicos utilizando diferentes modelos tumorais e espécies de animais.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABEL, Erika L.; ANGEL, Joe M.; KIGUCHI, Kaoru et al. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. **Nature protocols**, v. 4, n. 9, p. 1350-1362, 2009.

ADAMS, Sylvia; KOZHAYA, L.; MARTINIUK, F. et al. Topical TLR7 agonist imiquimod can induce immune-mediated rejection of skin metastases in patients with breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 24, p. 6748-6757, 2012.

ADIBKIA, Khosro. JAVADZADEH, Y.; DASTAMALCHI, S. et al. Naproxen – Eudragit® RS100 nanoparticles: preparation and physicochemical characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 1, p. 155-159, 2011.

AGUAYO-LEIVA, I. R.; RÍOS-BUCETA, L.; JAÉN-OLASOLO, P. Surgical vs nonsurgical treatment of basal cell carcinoma. **Actas Dermo-Sifiligráficas**, v. 101, n. 8, p. 683-692, 2010.

AL ASMARI, Abdulrahman K.; KHAN, Abdul Quaiyoom. Investigation of in vivo potential of scorpion venom against skin tumorigenesis in mice via targeting markers associated with cancer development. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 3387, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 de junho de 2003a

APALLA, Zoe; NASHAN, D.; WELLER, R. et al. Skin cancer: Epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. **Dermatology and therapy**, v. 7, n. 1, p. 5-19, 2017.

BAGDE, Arvind; MONDAL, Arindam; SINGH, Mandip. Drug delivery strategies for chemoprevention of UVB-induced skin cancer: A review. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 34, n. 1, p. 60-68, 2018.

BALZUS, B., SAHLE, F. F., HÖNZKE, S. et al. Formulation and ex vivo evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin and the corneal epithelium. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 122-130, 2017.

BANG, S. H.; HWANG, I. C.; YU, Y. M. et al. Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 7, p. 595-604, 2011.

BARCAUI, Elisa de Oliveira; CARVALHO, Antonio Carlos Pires; PIÑEIRO-MACEIRA, Juan et al. Study of the skin anatomy with high-frequency (22 MHz) ultrasonography and histological correlation. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 324-329, 2015.

BERTRAND, Nicolas; WU, Jun; XU, Xiaoyang et al. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, V. 66, p. 2-25, 2014.

BHATNAGAR, P.; PANT, A. B.; SHUKLA, Y. et al. Bromelain nanoparticles protect against 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene induced skin carcinogenesis in mouse model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 91, p. 35-46, 2015.

BIFFEN, M.; MATSUI, H.; EDWARDS, S. et al. Biological characterization of a novel class of toll-like receptor 7 agonists designed to have reduced systemic activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 2, p. 573-586, 2012.

BILATI, Ugo; ALLÉMANN, Eric; DOELKER, Eric. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67-75, 2005.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

ČALIJA, Bojan; SAVIC, Snezana; KRAJISNI, Danina et al. pH-sensitive polyelectrolyte films derived from submicron chitosan/Eudragit® L 100-55 complexes: Physicochemical characterization and in vitro drug release. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 39, 2015.

CAULIN, Carlos; NGUYEN, Thao; LANG, Gene A. et al. An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain-and loss-of-function p53 mutations. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 7, p. 1893, 2007.

CELIA, Ch.; TRAPASSO, E.; COSCO, D. et al. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n. 1, p. 155-160, 2009.

CETIN, Meltem; ATILA, Alptug; KADIOGLU, Yucel. Formulation and in vitro characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 3, p. 1250-1256, 2010.

CHEREDDY, Kiran Kumar; VANDERMEULEN, Gaëlle; PRÈAT, Véronique. PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 2, p. 223-236, 2016.

CHINEM, Valquiria Pessoa; MIOT, Hélio Amante. Epidemiologia do carcinoma basocelular. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, 2011.

CHOLLET, J. L.; JOZWIAKOWSKI, M. J.; PHARES, K. R. et al. Development of a topically active imiquimod formulation. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, n. 1, p. 35-43, 1999.

CHORILLI, Marlus; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, H. R. N. et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CLINICAL TRIALS. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

CONNIOT, J.; SILVA, J. M.; FERNANDES, J. G. et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, p. 105, 2014.

CROWSON, A. Neil. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. **Modern Pathology**, v. 19, p. S127-S147, 2006.

DE GRUIJL, Frank R.; van KRANEN, Henk J.; MULLENDERS, Leon H. F. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, n. 1, p. 19-27, 2001.

EL MAGHRABY, Gamal M.; BARRY, Brian W.; WILLIAMS, Adrian C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4-5, p. 203-222, 2008.

EL-NAHAS, A. E.; ALLAM, A. N.; ABDELMONSIF, D. A. et al. Silymarin-loaded Eudragit nanoparticles: Formulation, characterization, and hepatoprotective and Toxicity Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3076-3086, 2017.

FABBROCINI, Gabriella; TRIASSI, M.; MAURIELLO, M. C. et al. Epidemiology of skin cancer: role of some environmental factors. **Cancers**, v. 2, n. 4, p. 1980-1989, 2010.

FACINA, Taís. Estimativa 2012. Incidência de câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, n. 4, p. 557, 2011.

FAHRADYAN, Artur; HOWELL, Anna C.; WOLFSWINKEL, Erik M. et al. Updates on the management of non-melanoma skin cancer (NMSC). **Healthcare**, v. 5, n. 4: p. 82, 2017.

FAISAL, Waleed et al. Taste masking approaches for medicines. **Current drug delivery**, v. 15, n. 2, p. 167-185, 2018.

FEOKTISTOVA, Maria; PANAYOTOVA-DIMITROVA, Diana. Overcoming cell death resistance in skin cancer therapy: Novel translational perspectives. **Experimental Dermatology**, v. 26, n. 10, p. 854-857, 2017.

FESSI, H.; PUISIEUX, J. Ph.; DEVISSAGUET, N. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FESTA NETO, Cyro. Imiquimod 5% cream in the treatment of superficial and nodular basal cell carcinomas: study of 10 cases. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 6, 2002.

FRANK, L. A., CONTRI, R. V., BECK, R. C. et al. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 5, p. 623-639, 2015.

FRIEDRICH, Rossana Barcellos; FONTANA, Marcia Camponogara; BECK, Ruy Carlos R. et al. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1131-1136, 2008.

GABORIAU, Henri P.; MURAKAMI, Craig S. Skin anatomy and flap physiology. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 34, n. 3, p. 555-569, 2001.

GERSTER, J. F.; LINDSTROM, K. J.; MILLER, R. L. et al. Synthesis and structure-activity-relationships of 1 H-imidazo [4, 5-c] quinolines that induce interferon production. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 3481-3491, 2005

GLOWKA, Eliza; WOSICKA-FRACKOWIAK, Hanna; HYLAK, Kinga et al. Polymeric nanoparticles-embedded organogel for roxithromycin delivery to hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 75-84, 2014.

GONZÁLEZ-DELGADO, J. A.; CASTRO, P. M.; MACHADO, A. et al. Hydrogels containing porphyrin-loaded nanoparticles for topical photodynamic applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 510, n. 1, p. 221-231, 2016.

GOYAL, R.; MACRI, L. K.; KAPLAN, H. M. et al. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 77-92, 2016.

GUPTA, Vandana; DHOTE, Vipin; PAUL, Nath et al. Development of novel topical drug delivery system containing cisplatin and imiquimod for dual therapy in cutaneous epithelial malignancy. **Journal of Liposome Research**, v. 24, n. 2, p. 150-162, 2014.

HAMMADY, Taha; RABANEL, J. M.; DHANIKULA, R. S. et al. Functionalized nanospheres loaded with anti-angiogenic drugs: cellular uptake and angiostatic efficacy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 418-427, 2009.

HAQUE, S. E.; SHEELA, A. Miscibility of eudragit/chitosan polymer blend in water determined by physical property measurements. **International journal of pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 648-653, 2013.

HAQUE, T.; RAHMAN, K. N.; THURSTON, D. E. et al. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 279-289, 2015.

HEDAYAT, Mona; NETEA, Mihai G.; REZAEI, Nima. Targeting of toll-like receptors: a decade of progress in combating infectious diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 702-712, 2011.

HIRSCHBERG, H. J.; van RIET, E.; OOSTERHOFF, D. et al. Animal models for cutaneous vaccine delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, p. 112-122, 2015.

HUANG, S.-W.; LIU, K. T.; CHANG, C. C. et al. Imiquimod simultaneously induces autophagy and apoptosis in human basal cell carcinoma cells. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 2, p. 310-320, 2010.

HUSSAIN, Zahid; KATAS, Haliza; AMIN, Mohd Cairul Iqbal Mohd et al. Self-assembled polymeric nanoparticles for percutaneous co-delivery of hydrocortisone/hydroxytyrosol: an ex vivo and in vivo study using an NC/Nga mouse model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 444, n. 1, p. 109-119, 2013.

HWA, Charlotte; BAUER, Eugene, A.; COHEN, David, E. Skin biology. **Dermatologic Therapy**, v. 24, n. 5, p. 464-470, 2011.

HWANG, Heehong; MIN, Hyunjung; KIM, Donghoon et al. Imiquimod induces a toll-like receptor 7-independent increase in intracellular calcium via IP3 receptor activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 875-879, 2014.

HYDE, M. A.; HADLEY, M. L.; TRISTANI-FIROUZI, P.; GOLDFAR, D.; BOWEN, G. M. A randomized trial of the off-label use of imiquimod, 5%, cream with vs without tazarotene, 0.1%, gel for the treatment of lentigo maligna, followed by conservative staged excisions. **Arch. Dermatol.**, v. 148, n. 5, p. 592-6, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. Rev. 02. 24 p.

JAIN, Subheet Kumar; PURI, Richa; MAHAJAN, Mohit et al. Nanovesicular carrier-based formulation for skin cancer targeting: evaluation of cytotoxicity, intracellular uptake, and preclinical anticancer activity. **Journal of drug targeting**, v. 23, n. 3, p. 244-256, 2015.

JANG, Min Soo; BAEK, Jae Woo; PARK, J. B et al. Large superficial basal cell carcinoma arising in the scalp. **Annals of Dermatology**, v. 23, n. 1, p. S96-S99, 2011.

JEPPS, O. G.; DANKIK, Y.; ANISSIMOV, Y. G. et al. Modeling the human skin barrier – towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 152-168, 2013.

JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, Gloria; PAVOT, V.; CHANE-HAONG, C. et al. Preparation and in vitro evaluation of imiquimod loaded polylactide-based micelles as potential vaccine adjuvants. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 1, p. 311-320, 2015.

KAIREMO, Kalevi; ERBA, Paola; BERGSTRÖM, Kim et al. Nanoparticles in cancer. **Current Radiopharmaceuticals**, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2008.

KANG, Sammy S. W.; KAULS, Lynda S.; GASPARI, Anthony A. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 6, p. 951-983, 2006.

KARVE, S. J.; FELDMAN, B. A.; YENTZER, D. J. et al. Imiquimod: a review of basal cell carcinoma treatments. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 7, n. 11, p. 1044, 2008.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010.

KEMP, Christopher J. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2005. p. 460-473.

KHAN, Azmat Ali. Pro-apoptotic activity of nano-escheriosome based oleic acid conjugate against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) induced cutaneous carcinogenesis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 295-302, 2017.

KILIAN, Dewald; SHAHZAD, Yasser; FOX, Lizelle et al. Vesicular carriers for skin drug delivery: the Pheroid™ technology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 20, p. 2758-2770, 2015.

KOLENYAK DOS SANTOS, F., HELENA OYAFUSO, M., PRISCILA KIILL, C. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of hyperproliferative skin diseases-a review. **Current Nanoscience**, v. 9, n. 1, p. 159-167, 2013

KOWALCZUK, A.; TRZCINSKA, R; TRZEBICKA, B. et al. Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 1, p. 43-86, 2014.

KUMARI, Avnesh; YADAV, Sudesh Kumar; YADAV, Subhash C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

KUZNETSOVA, S. A. et al. In vitro studies of changes in human endothelial cell functions under the effect of imiquimod. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 154, n. 2, p. 237-240, 2012.

LACARRUBBA, Francesco; NASCA, Maria Rita; MICALI, Giuseppe. Advances in the use of topical imiquimod to treat dermatologic disorders. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 4, n. 1, p. 87, 2008.

LARANJEIRA, Mauro; FÁVERE, Valfredo T. de. Chitosan: functional byopolymer with biomedical industrial potential. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LAI, Wing-Fu; HE, Zhen-Dan. Design and fabrication of hydrogel-based nanoparticulate systems for in vivo drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 243, p. 269-282, 2016.

LEE, Woan-Ruoh; SHEN, S.C.; AL-SUWAYEH, S. A. et al. Laser-assisted topical drug delivery by using a low-fluence fractional laser: imiquimod and macromolecules. **Journal of controlled release**, v. 153, n. 3, p. 240-248, 2011.

LI, V. W.; LI, W. W.; TALCOTT, K. E. et al. Imiquimod as an antiangiogenic agent. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 4, n. 6, p. 708-717, 2005.

LÓPEZ-LEÓN, T.; CARVALHO, E. L. S.; SEIJO, B. et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, n. 2, p. 344-351, 2005.

LÜ, J.-M.; WANG, X.; MARIN-MULLER, C. et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 9, n. 4, p. 325-341, 2009.

MACEDO, Erick Marcet Santiago de; CARNEIRO, Rachel Camargo; MATAYOSHI, Suzana. New approach to periocular basal cell carcinoma treatment: imiquimod.2007, **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 66, n. 6, p. 411-17, 2007.

MAJEWSKI, S.; MARCZAK, M.; MLYNARCZYK, B. et al. Imiquimod is a strong inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 1, p. 14-19, 2005.

MAKSIMOVIC, Srdjan; NAKATANI, M.; BABA, Yoshichika et al. Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. **Nature**, v. 509, n. 7502, p. 617-621, 2014.

MARTINS, M. R.; VEIGA, Francisco. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, 2002.

MAVUSO, S.; MARIMUTHU, T.; CHOONARA, Y. E. et al. A review of polymeric colloidal nanogels in transdermal drug delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 20, p. 2801-2813, 2015.

McCUAIG, Catherine C.; DUBOIS, J.; POWELL, J. et al. A phase II, open-label study of the efficacy and safety of Imiquimod in the treatment of superficial and mixed infantile hemangioma. **Pediatric Dermatology**, v. 26, n. 2, p. 203-212, 2009.

MESCHER, Anthony L. **Junqueira's basic histology: Text and atlas**, 14<sup>th</sup> Edition. New York: McGraw-Hill Professional. 2009. 480 p. Disponível em: <<http://www.lange textbooks.com/0071842705.php?c=key>>. Acesso em: 24 out. 2017.

MENEZES, A. C.; RAPOSO, S.; SIMÕES, S. et al. Prevention of photocarcinogenesis by agonists of 5-HT1A and antagonists of 5-HT2A receptors. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 2, p. 1145-1164, 2016.

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

MONTANARI, T. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. da autora, 2016. 229 p.

NAZIR, S.; HUSSAIN, T.; AYUB, A. et al. Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 1, p. 19-34, 2014.

NIRMALA, J. Grace; NARENDHIRAKANNAN, R. T. Vitis vinifera peel and seed gold nanoparticles exhibit chemopreventive potential, antioxidant activity and induce apoptosis through mutant p53, Bcl-2 and pan cytokeratin down-regulation in experimental animals. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 902-917, 2017.

OLDFIELD, Vicki; KEATING, Gillian M.; PERRY, Caroline M. Imiquimod. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 6, n. 3, p. 195-200, 2005.

OLEJNIK, A.; GOSCIANSKA, J.; ZIELINSKA, A. et al. Stability determination of the formulations containing hyaluronic acid. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 4, p. 401-407, 2015.

OURIQUE, A. F.; MELERO, A. Z.; SILVA, C. B. et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: development of a semisolid nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 1, p. 95-101, 2011.

OVALLE, William; NAHIRNEY, Patrick C. **Netter bases da histologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2014. 536 p.

- PALMER, Brian C.; DELOUISE, Lisa A. Nanoparticle-enabled transdermal drug delivery systems for enhanced dose control and tissue targeting. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1719, 2016.
- PANDO, D.; CADDEO, C.; MANCONI, M. et al. Nanodesign of olein vesicles for the topical delivery of the antioxidant resveratrol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 8, p. 1158-1167, 2013.
- PATRA, Ch. N.; PRIYA, R.; SWAIN, S. et al. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, 2017. (In press)
- PENNY, Lewis K.; WALLACE, HEATHER M. The challenges for cancer chemoprevention. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 24, p. 8836-8847, 2015.
- PHAM, Q. D.; BJÖRKLUND, S.; ENGBLOM, J. et al. Chemical penetration enhancers in stratum corneum – Relation between molecular effects and barrier function. **Journal of Controlled Release**, v. 232, p. 175-187, 2016.
- PLANZ, Viktoria; LEHR, Claus-Michael; WINDBERGS, Maike. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 89-104, 2016.
- POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C. de G. et al. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: a relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, n. 1, p. 288-293, 2008.
- PRABHU, Rashmi H.; PATRAVALE, Vandana B.; JOSHI, Medha D. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 1001, 2015.
- PRAÇA, F. S. G., MEDINA, W. S. G., ELOY, J. O., PETRILLI, R., CAMPOS, P. M., ASCENSO, A., BENTLEY, M. V. L. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121-132, 2018.
- PRIYANKA, Karunanidhi; SINGH, Sanjay. A review on skin targeted delivery of bioactives as ultradeformable vesicles: overcoming the penetration problem. **Current Drug Targets**, v. 15, n. 2, p. 184-198, 2014.
- PROIKAKIS, C. S.; TARANTILI, P. A.; ANDREOPOULOS, A. G. The role of polymer/drug interactions on the sustained release from poly (DL-lactic acid) tablets. **European Polymer Journal**, v. 42, n. 12, p. 3269-3276, 2006.
- RAMINENI, Sandeep K.; LARRY, L. Cunningham; DZIUBLA, Thomas D. et al. Development of Imiquimod-loaded mucoadhesive films for oral dysplasia. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 2, p. 593-603, 2013.
- RAO, J. Prasad; GECKELER, Kurt E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

RÊGO, I. O. P.; CANÇADO, T. C.; FIGUEIREDO, L. D. M. et al. Influência do período de armazenamento na qualidade do ovo integral pasteurizado refrigerado. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 735-742, 2012.

REHMAN, Khurram; ZULFAKAR, Mohd Hanif. Novel fish oil-based bigel system for controlled drug delivery and its influence on immunomodulatory activity of imiquimod against skin cancer. **Pharmaceutical research**, v. 34, n. 1, p. 36-48, 2017.

REIJRINK, I. A. M.; BERGHMANS, D.; MEIJERHOF, R. et al. The chicken embryo and its micro environment during egg storage and early incubation. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, n. 4, p. 581-598, 2008.

RIZI, Khalida; GREEN, R. J.; KHUTORYANSKAYA, O. et al. Mechanisms of burst release from pH-responsive polymeric microparticles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 9, p. 1141-1155, 2011.

SAHLE, Fitsum Feleke; GERECKE, Christian; KLEUSER, Burkhard et al. Formulation and comparative in vitro evaluation of various dexamethasone-loaded pH-sensitive polymeric nanoparticles intended for dermal applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 516, n. 1-2, p. 21-31, 2017.

SAINI, M. R.; GOYAL, Pradeep Kumar; CHAUDHARY, Geeta. Anti-tumor activity of Aloe vera against DMBA/croton oil-induced skin papillomagenesis in Swiss albino mice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 29, n. 2, 2010.

SANTOS, José E. dos; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; dos et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SAVOIA, Paola; CREMONA, Ottavio; FAVA, Paolo. New perspectives in the pharmacological treatment of non-melanoma skin cancer. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 3, p. 353-374, 2016.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende; GUTERRES, Sílvia Sanisçuaski; FREITAS, Liane de Lucca et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHÖN, Margarete; SCHÖN, Michael P. Immune modulation and apoptosis induction: two sides of the antitumoral activity of imiquimod. **Apoptosis**, v. 9, n. 3, p. 291-298, 2004.

SCHÖN, Margarete; SCHÖN, Michael P. The antitumoral mode of action of imiquimod and other imidazoquinolines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 681-687, 2007.

SEREMETA, Katia P.; CHIAPPETTA, Diego A.; SOSNIK, Alejandro. Poly (-caprolactone), Eudragit® RS 100 and poly (-caprolactone)/Eudragit® RS 100 blend submicron particles for the sustained release of the antiretroviral efavirenz. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 441-449, 2013.

SEVERINO, P.; FANGUEIRO, J. F.; FERREIRA, S. V. et al. Nanoemulsions and nanoparticles for non-melanoma skin cancer: effects of lipid materials. **Clinical and Translational Oncology**, v. 15, Issue 6, p. 417-424, 2013.

SHAN, Yunlong; WEI, Zhonghong; TAO, Li et al. Prophylaxis of diallyl disulfide on skin carcinogenic model via p21-dependent Nrf2 stabilization. **Scientific Reports**, v. 6, p. 35676, 2016.

SHARMA, Jyoti; SINGH, Ritu; GOYAL, P. K. Chemomodulatory potential of flaxseed oil against DMBA/croton oil-induced skin carcinogenesis in mice. **Integrative cancer therapies**, v. 15, n. 3, p. 358-367, 2016.

SHARMA, Navneet; MADAN, Parshotam; LIN, Senshang. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 404-416, 2016.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 8-42, 2015.

SINGH, S.; ZAFAR, A.; KHAN, S. et al. Towards therapeutic advances in melanoma management: An overview. **Life Sciences**, v. 174, p. 50-58, 2017.

TEIXEIRA, Maribe; ALONSO, Maria J.; PINTO, Madalena M. M. et al. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 3, p. 491-500, 2005.

TELÒ, I.; PESCHINA, S.; SANTI, P. et al. Mechanisms of imiquimod skin penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 1, p. 516-523, 2016.

THAKRAL, Naveen K.; RAY, Alok R.; MAJUMDAR, Dipak K. Eudragit S-100 entrapped chitosan microspheres of valdecoxib for colon cancer. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 9, p. 2691-2699, 2010.

TREMAINE, A. M.; ARMSTRONG, J.; HUANG, Y. C.; ELKEEB, L.; ORTIZ, A.; HARRIS, R.; CHOI, B.; KELLY, K. M. Enhanced port-wine stain lightening achieved with combined treatment of selective photothermolysis and imiquimod. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 66, n. 4, p. 634-41, 2012.

TURBISCAN, F. **Smart scientific A**. 2015. Disponível em: <<http://www.formulation.com/stability-turbiscan-lab.html>> Acesso em: 15 jan. 2017.

ÜNAL, Hale; PAGANO, Ester; D'ANGELO, Ivana et al. Core-shell hybrid nanocapsules for oral delivery of camptothecin: formulation development, in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 1, p. 42, 2015.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 32<sup>nd</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convencion, 2009. p. 1430.

VACCHELLI, E.; GALLUZZI, L.; EGGERMONT, A. et al. Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 6, p. 894-907, 2012.

VALACHOVIC, Edward; ZURBENKO, Igor. Multivariate analysis of spatial–temporal scales in melanoma prevalence. **Cancer Causes & Control**, v. 28, n. 7, p. 733-743, 2017.

van der GUCHT, Jasper; SPRUIJT, E.; LEMMERS, M. et al. Polyelectrolyte complexes: bulk phases and colloidal systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n. 2, p. 407-422, 2011.

VARSHOSAZ, Jaleh; TAYMOURI, Somaih; HAMISHEHKAR, Hamed. Fabrication of polymeric nanoparticles of poly (ethylene-co-vinyl acetate) coated with chitosan for pulmonary delivery of carvedilol. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 1, 2014.

VENTURINI, Cristina G., BRUINSMANN, F. A., CONTRI, Renata. V. et al. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 36-43, 2015.

VENUS, Matt; WATERMAN, Jacqueline; McNAB, Ian. Basic physiology of the skin. **Surgery**, v. 29, n. 10, p. 471-474, 2011.

VERMA, Parmanand; GUPTA, Roop Narayan; KUMAR, Arvind et al. Development, in vitro and in vivo characterization of Eudragit RL 100 nanoparticles for improved ocular bioavailability of acetazolamide. **Drug Delivery**, v. 20, n. 7, p. 269-276, 2013.

VIDAL, D.; MATÍAS-GUIU, X.; ALOMAR, A. Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki67, p53 and basal cell carcinoma apoptosis. **British Journal of Dermatology**, v. 151, n. 3, p. 656-662, 2004.

VIEIRA, Simone M.; MICHELS, L. R.; ROVERSI, K. et al. A surface modification of clozapine-loaded nanocapsules improves their efficacy: A study of formulation development and biological assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 748-756, 2016.

VILLANOVA, Janaina CO; ORÉFICE, Rodrigo L.; CUNHA, Armando S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VITORINO, Carla; SOUSA, João; PAIS, Alberto. Overcoming the skin permeation barrier: challenges and opportunities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 20, p. 2698-2712, 2015.

VOGT, D. J.; VOGHT, K. A.; GMUR, S. J. et al. Vulnerability of tropical forest ecosystems and forest dependent communities to droughts. **Environmental Research**, v. 144, p. 27-38, 2016.

VRIGNAUD, Sandy; BENOIT, Jean-Pierre; SAULNIER, Patrick. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8593-8604, 2011.

WANG, Yen-Jen; CHIEN, Yin-Chih; WU, Chieh-Hsi et al. Magnolol-loaded core–shell hydrogel nanoparticles: drug release, intracellular uptake, and controlled cytotoxicity

for the inhibition of migration of vascular smooth muscle cells. **Molecular pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 2339-2349, 2011.

WU, Tzu-Hui; YEN, F. L.; LIN, L. T. et al. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1, p. 160-168, 2008.

WU, Libo; ZHANG, Jian; WATANABE, Wiwik. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YANG, A. Y.; LEE, J. H.; ZHANG, C. et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in UVB- and DMBA/TPA-induced mouse skin cancer models. **Life sciences**, v. 113, n. 1, p. 45-54, 2014.

YE, Z.; SQUILLANTE, E. The development and scale-up of biodegradable polymeric nanoparticles loaded with ibuprofen. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 422, p. 75-80, 2013.

YOO, E.; CRALL, B. M.; BALAKRISHNA, R. et al. Structure-activity relationships in Toll-like receptor 7 agonistic 1H-imidazo[4,5-c]pyridines. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 38, p. 6526-6245, 2013.

ZHANG, Zheng; TSAI, Pei-Chin; RAMEZANLI, Tannaz et al. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 205-218, 2013.

ZHENG, Ai-Wen; JIA, D. D.; XIA, L. M. et al. Impact of carboplatin plus paclitaxel combined with endostar against A375 melanoma cells: An in vitro and in vivo analysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1321-1326, 2016.

## **ANEXO**

