

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de hidrogel de pectina contendo nanocápsulas poliméricas de imiquimode visando ao tratamento do melanoma

RAFAELA PLETSCH GAZZI

Porto Alegre, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de hidrogel de pectina contendo nanocápsulas poliméricas de imiquimode visando ao tratamento do melanoma

Dissertação apresentada por **Rafaela Pletsch Gazi** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Luiza Abrahão Frank

Porto Alegre, 2021

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 06.05.2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Sílvia Ligório Fialho

Fundação Ezequiel Dias

Prof. Dr. Danielle da Silva Trentin

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dr. Valquíria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Gazzi, Rafaela
Desenvolvimento de hidrogel de pectina contendo nanocápsulas poliméricas de imiquimode visando ao tratamento do melanoma / Rafaela Gazzi. -- 2021.
176 f.
Orientadora: Silvia Guterres.

Coorientadora: Luiza Frank.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Nanocápsulas poliméricas. 2. Imiquimode. 3. Pectina. 4. Melanoma. I. Guterres, Silvia, orient. II. Frank, Luiza, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405 do Departamento Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Agradecimentos a CAPES, CNPq e FAPERGS pelo financiamento que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha orientadora Silvia e à minha coorientadora Luiza. Professora Silvia, muito obrigada por me acolher no seu grupo de pesquisa quando eu ainda estava no início da faculdade, obrigada por compartilhar sua experiência e conhecimento comigo, e por sempre incentivar a independência e criatividade dos seus alunos. Admiro a profissional que tu és e a carreira que construístes. Obrigada por despertar em mim a paixão pela pesquisa. Luiza, muito mais que minha coorientadora no trabalho de conclusão de curso e agora no mestrado, tu te tornaste uma grande amiga. Obrigada por me acompanhar (com muita paciência) desde 2015, quando comecei no laboratório como aluna de iniciação científica e por todas as oportunidades que me deste ao longo destes anos. Tu com certeza tivestes grande participação na construção da profissional e pesquisadora que sou hoje.

Agradeço à minha família. Meus pais, Cristina e Sandro, por todos os ensinamentos, valores, conselhos, amor e carinho. Obrigada pelo incentivo ao longo de toda minha trajetória, obrigada por me acalmarem nos momentos de aflição, que não foram poucos, e obrigada por terem sempre colocado o estudo em primeiro lugar na minha vida e dos meus irmãos. Agradeço aos meus irmãos, Lucas e Thais. Lucas, obrigada pelo convívio diário, pelas risadas e companhia. Thais, obrigada por toda a ajuda, mesmo estando longe. Obrigada por me incentivar e encorajar a seguir meus sonhos e por ser um exemplo para mim. Agradeço também aos meus avós, Vitória e Claudino. Obrigada por terem sido exemplo de pessoas batalhadoras e por ensinarem que o nosso bem mais valioso é o conhecimento.

À grande amiga que a faculdade me deu, Isadora. Agradeço por termos passado por tantas etapas importantes juntas: os anos de faculdade, o trabalho de conclusão de curso, nossa formatura, e agora o mestrado. Obrigada pela companhia nos almoços, pelos cafezinhos entre um experimento e outro, pelas risadas, conselhos e por sempre me estender a mão quando precisei.

Agradeço a todo o grupo do Laboratório 405, pela companhia, ajuda e união. Agradeço especialmente aos grandes amigos que fiz no laboratório: Andrey, Tainara e Giovana. Obrigada por tornarem o dia a dia no laboratório tão leve e divertido.

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele que, apesar de apresentar baixas taxas de incidência, é altamente agressivo e letal devido ao seu potencial metastático. Estudos da literatura têm indicado o imiquimode, um imunomodulador de uso tópico, como um candidato eficaz para o tratamento do melanoma. No entanto, o uso deste fármaco está relacionado com o aparecimento de efeitos adversos intensos, como: coceira, irritação, dor, vermelhidão e edema. Além disso, uma limitação que o uso de formulações tópicas pode apresentar é a baixa (ou insuficiente) penetração do ativo na pele. Neste sentido, este trabalho teve o objetivo de desenvolver e avaliar o desempenho de uma formulação inovadora que associa imiquimode, nanocápsulas poliméricas e pectina, como uma nova abordagem para o tratamento do melanoma. As nanocápsulas poliméricas foram utilizadas como estratégia para potencializar a ação do fármaco e controlar sua liberação, e a pectina foi empregada para a produção de um veículo semissólido (hidrogel) capaz de modular a penetração do imiquimode na pele. A suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo imiquimode (NCimiq) foi capaz de diminuir a viabilidade celular (linhagem tumoral SK-MEL-28) de forma tempo-dependente (79% de células viáveis em 24 h e 55% em 72 h), o que não foi observado nas células tratadas com a solução do fármaco (Imiq) (99% em 24 h e 91% em 72 h). O estudo de liberação *in vitro* mostrou que 63% de fármaco foi liberado a partir do hidrogel de pectina contendo Imiq (PEC-imiq) em 2 horas. Em comparação, 60% de fármaco foi liberado a partir do hidrogel de pectina contendo NCimiq (PEC-NCimiq) em 8 horas. O estudo de permeação *in vitro* mostrou que 2,5 µg de imiquimode permeou a pele após 8 horas de contato quando PEC-NCimiq foi aplicado, enquanto que apenas 2,1 µg de imiquimode permeou a pele após 12 horas de contato quando PEC-imiq foi aplicado. Os hidrogéis de pectina possibilitaram a penetração do fármaco em todas as camadas da pele, principalmente na derme (PEC-NCimiq = 6,8 µg e PEC-imiq = 4,3 µg). Esses resultados demonstraram que a nanoencapsulação do imiquimode proporcionou maior efeito citotóxico do fármaco frente à linhagem de células de melanoma testada, e a incorporação do imiquimode nanoencapsulado em um veículo a base de pectina proporcionou maior permeação do fármaco através da pele. Em paralelo com a realização da parte experimental desta pesquisa, a revisão da literatura sobre dois temas centrais deste projeto foi realizada: o uso da pectina em aplicações farmacêuticas e o uso de nanopartículas como sistemas carreadores de fármacos. Esta revisão da literatura resultou em um artigo publicado na forma de *short communication* e três capítulos de livro, os quais fazem parte do corpo desta dissertação e foram essenciais para a interpretação e discussão dos resultados experimentais obtidos.

Palavras-chave: Melanoma, nanocápsulas poliméricas, imiquimode, pectina.

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer that, despite presenting low incidence rates, is highly aggressive and lethal due to its metastatic potential. Studies in the literature have indicated imiquimod, a topically applied immune response modifier agent, as an effective candidate for the treatment of melanoma. However, the use of this drug is associated with intense side effects, for example: itching, burning, pain, erythema, and edema. Besides that, a limitation that the use of topical formulations may present is the low (or insufficient) drug penetration into the skin. In this regard, this study aimed to develop and evaluate the performance of an innovative formulation that associates imiquimod, polymeric nanocapsules, and pectin as a new therapeutic scheme for melanoma treatment. Polymeric nanocapsules were used as a strategy to enhance drug action and control drug release, and pectin was applied to produce a semisolid vehicle (hydrogel) capable of modulating the penetration of imiquimod into the skin. Imiquimod-loaded polymeric nanocapsules suspension (NCimiq) was capable of decreasing cell viability (SK-MEL-28 tumor cell line) in a time-dependent manner (79% viable cells in 24 h and 55% in 72 h), which was not observed in cells treated with the solution of the drug (Imiq) (99% viable cells in 24 h and 91% in 72 h). *In vitro* drug release study showed that 63% of imiquimod was released from the pectin-based hydrogel containing the drug (PEC-imiq) after 2 h. In comparison, 60% of the drug was released from pectin-based hydrogel containing NCimiq (PEC-NCimiq) after 8 h. The *in vitro* permeation study showed that 2.5 μg of imiquimod permeated the skin within 8 h when PEC-NCimiq was assayed, whereas only 2.1 μg of drug permeated after 12 h of contact when PEC-imiq was assayed. Pectin-based hydrogels enabled drug penetration in all skin layers, especially the dermis (PEC-NCimiq = 6.8 μg and PEC-imiq = 4.3 μg). These results demonstrated that the nanoencapsulation provided higher cytotoxic effect of imiquimod in the melanoma cell line tested. Also, the incorporation of the nanoencapsulated imiquimod into pectin-based vehicle increased drug permeation through the skin. In parallel with the experimental part of this work, the review of the literature on two main themes of this project was carried out: pectin in pharmaceutical applications and the use of nanoparticles as drug carrier systems. This research resulted in one short communication and three book chapters, which are described in this thesis and were essential for the interpretation and discussion of the experimental data obtained.

Keywords: Melanoma, polymeric nanocapsules, imiquimod, pectin.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Objetivos	25
Encartes de publicação	
3. Capítulo 1	33
4. Capítulo 2	43
5. Capítulo 3	73
6. Capítulo 4	93
7. Discussão geral	125
8. Conclusão	133
9. Perspectivas.....	137
10. Referências	141
11. Apêndice	149

INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pelo rápido e incontrolável crescimento de células anormais. O câncer de pele é o tipo de câncer mais incidente no mundo (ESTEVA et al., 2017; BRAY et al., 2018) e pode ser classificado como não melanoma ou melanoma. O motivo pelo qual o câncer de pele não é classificado como o mais incidente na população mundial é pelo alto número de subnotificações dos casos do tipo não melanoma. Isso ocorre, pois tais casos não necessitam ser reportados nos registros de incidência de câncer (CANCER FACTS & FIGURES 2019) e, conseqüentemente, não são incluídos nas estimativas globais da doença. O desenvolvimento de câncer de pele está relacionado com fatores genéticos (intrínsecos) e fatores ambientais (extrínsecos). Dentre os fatores genéticos, podem-se citar pessoas com pele clara, cabelos ruivos ou loiros, com presença de sardas ou pessoas albinas. Em relação aos fatores ambientais, o maior fator de risco é a exposição à radiação UV (CRAYTHORNE et al., 2017).

Considerando o câncer de pele no cenário brasileiro, o tipo não melanoma apresenta maior incidência (corresponde a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país). Ele é classificado como carcinoma basocelular (CBC), que tem origem nas células basais e é o tipo de câncer de pele mais comum, e carcinoma espinocelular (CCE), que tem origem nas células escamosas da epiderme ou mucosas (CRAYTHORNE et al., 2017). A localização dessas células na pele está indicada na figura 1. Por outro lado, o melanoma deriva dos melanócitos, células produtoras de pigmento (SCHADENDORF et al., 2015) (figura 1). Apesar deste tipo de câncer ser menos incidente (representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão), ele é o tipo mais agressivo e mais letal devido ao seu potencial metastático (DOMINGUES et al., 2018). Foram contabilizadas 1.978 mortes por melanoma no Brasil em 2019, sendo 1.159 homens e 819 mulheres. Além disso, o Instituto Nacional do Câncer estima 8.450 novos casos deste câncer Brasil (dados de 2020). O melanoma pode ser classificado em cinco estágios (0-4). Se a lesão for diagnosticada e tratada precocemente (estágios iniciais), a doença possui bom prognóstico (CRAYTHORNE et al., 2017); no entanto, uma vez que inicia metástase (estágio 3 ou 4), o prognóstico é baixo (DOMINGUES et al., 2018). Seu tratamento inclui remoção cirúrgica da lesão,

quimioterapia, imunoterapia e/ou tratamento em receptores alvo (MISHRA et al., 2018).

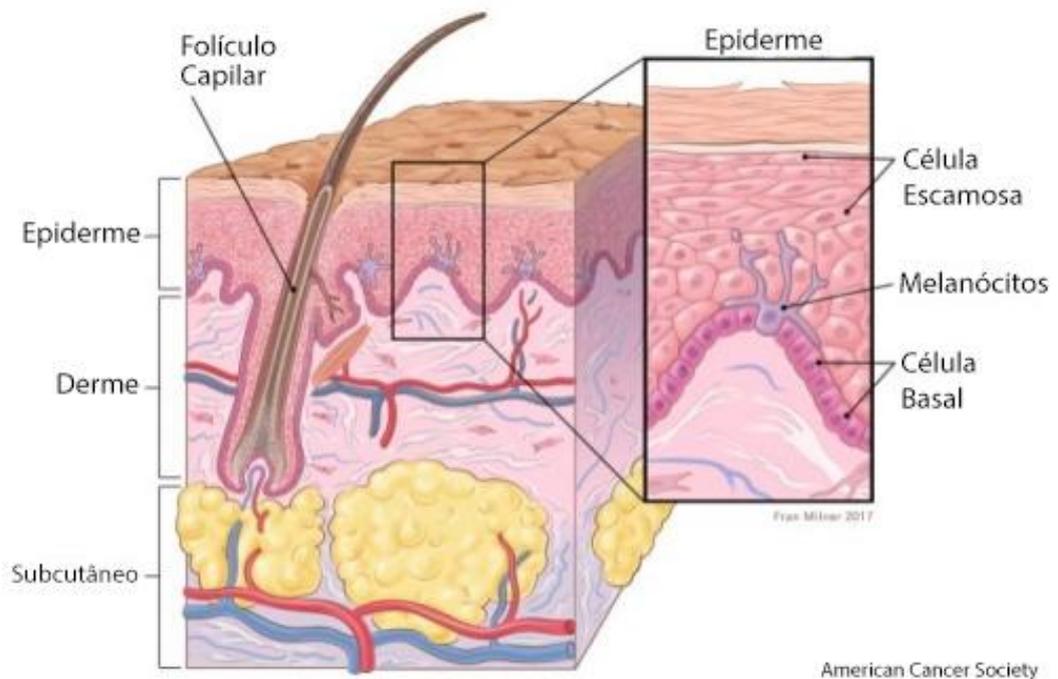


Figura 1. Camadas da pele e tipos celulares.

O tratamento com formulações tópicas apresenta-se como uma alternativa à remoção cirúrgica ou como uma terapia adjuvante (visto que pode auxiliar na eliminação de células tumorais remanescentes após excisão da lesão). Não existem, atualmente, formulações tópicas comercialmente disponíveis para o tratamento do melanoma, e diversos podem ser os motivos para isso, por exemplo: dificuldade de penetração do fármaco na pele para atingir as células tumorais e efeitos adversos intensos ocasionados pelo tratamento. No entanto, a importância de existir tal tipo de tratamento é evidenciada pelos estudos clínicos que investigam a eficácia de tratamentos tópicos para o melanoma (www.clinicaltrials.gov, acessado em 06 de abril de 2021).

O imiquimode (figura 2) é um fármaco imunomodulador de uso tópico que possui potente ação antiviral e antitumoral (GUPTA et al., 2002). Ele age pela ativação de receptores toll-like 7 e 8, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{INF-}\alpha$, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-12 , o que leva ao aumento da resposta imune do organismo (MISHRA et al., 2018).

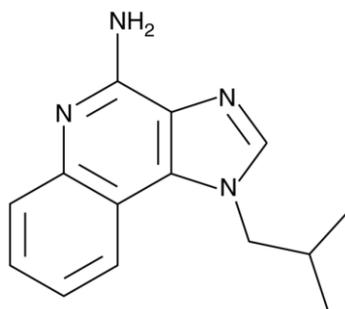


Figura 2. Estrutura química do imiquimode

Este fármaco é aprovado pelo FDA para o tratamento de verrugas genitais externas e perianais e para o tratamento do carcinoma de células superficiais basais. No entanto, trabalhos da literatura já apontam um grande potencial de uso do imiquimode para o tratamento do câncer cervical (FRANK et al., 2017; FRANK et al., 2019; FRANK et al., 2020) e outros tipos de câncer de pele, tanto melanoma (BURNS et al., 2005; ASPORD et al., 2014) quanto não melanoma (UROSEVIC et al., 2004; BURNS et al., 2005). Além disso, dezoito estudos clínicos, já finalizados ou em andamento, podem ser encontrados no site ‘www.clinicaltrials.gov’, no que se refere ao uso deste fármaco para o tratamento do melanoma.

Devido à sua modulação no sistema imune e às altas doses utilizadas durante o tratamento (creme comercial Modik[®] ou Ixium[®] possuem 5% de ativo), seu uso está relacionado com o aparecimento de efeitos adversos tópicos, como coceira, irritação, dor, vermelhidão e edema (GUPTA et al., 2002), e sistêmicos, como febre, fadiga, cefaléia e diarreia (WIELAND et al., 2006; KREUTER et al., 2008). Esses efeitos adversos muitas vezes levam ao abandono do tratamento. Um dos motivos pelo qual o imiquimode não é testado e utilizado para outros tipos de câncer, por exemplo, do trato gastrointestinal, pode ser a intensidade dos efeitos adversos causados.

O artigo de revisão de BURNS e colaboradores (2005) compila os trabalhos publicados que utilizaram o imiquimode tópico para o tratamento de pacientes com lesões de pele pré-cancerígenas e cancerígenas. NAYLOR e colaboradores (2003) trataram 28 pacientes com lentigo maligno (melanoma *in situ*), e 93% apresentaram remissão completa das lesões sem lesões reincidentes detectadas. WOLF e colaboradores (2003) avaliaram o uso do imiquimode tópico para o tratamento de

melanoma metastático em dois pacientes, uma mulher de 86 anos tratada por quatro meses (sem linfonodos comprometidos) e um homem de 49 anos tratado por oito meses (linfonodos comprometidos), e ambos apresentaram remissão completa (avaliação clínica e histológica). Apesar dos resultados positivos observados, os autores dos estudos citados acima relataram que a maioria dos pacientes, se não todos, apresentaram efeitos adversos locais leves a moderados (principalmente eritema e coceira) e alguns pacientes apresentaram reações locais mais severas ou sistêmicas.

Além dos efeitos citados relacionados ao imiquimode, uma limitação relacionada às formulações de uso tópico para o tratamento de doenças que acometem a pele é a dificuldade de penetração. Visto que no câncer do tipo melanoma as células tumorais estão localizadas na derme, é necessário que o fármaco aplicado seja capaz de permear a pele até atingir a camada afetada.

A nanotecnologia pode ser utilizada como uma estratégia para contornar as limitações comentadas anteriormente relacionadas ao uso do imiquimode. As nanocápsulas poliméricas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido no núcleo e/ou adsorvido na parede polimérica (SCHAFFAZICH e GUTERRES 2003). Por ser um fármaco lipossolúvel, o imiquimode pode ser incorporado nestes nanocarreadores. Dentre as vantagens apresentadas pelas nanocápsulas poliméricas como sistemas carreadores de fármacos, pode-se citar a diminuição dos efeitos adversos causados pelo fármaco, devido ao controle da liberação da substância (COUVREUR et al., 2002; SCHAFFAZICK e GUTERRES 2003; CONTRI et al., 2014). Trabalhos na literatura já mostraram a diminuição de efeitos adversos de fármacos muito irritantes, como a capsaicina, após a nanoencapsulação (CONTRI et al., 2014). Além disso, as nanocápsulas poliméricas provaram-se capazes de aumentar o transporte de fármacos pela pele (ALVES et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2010; CONTRI et al., 2014). Estes estudos mostraram que fármacos nanoencapsulados são capazes de penetrar nas camadas da pele de forma mais efetiva que os fármacos não encapsulados.

Outro fator que torna interessante a nanoencapsulação do imiquimode é a ação frente a células tumorais. A combinação de nanocarreadores com fármacos

antitumorais tem a capacidade de aumentar a ação do fármaco em linhagens de células tumorais, em comparação com a sua forma não encapsulada, conforme mostrado na literatura (PAOLINO et al., 2013; FRANK et al., 2019). Desta forma, há a possibilidade de diminuição da dose utilizada, também contribuindo para diminuição dos efeitos adversos.

A incorporação deste fármaco em nanocápsulas poliméricas já está descrita na literatura. VENTURINI e colaboradores (2015) avaliaram a ação citotóxica de nanocápsulas poliméricas contendo imiquimode em células não-tumorais da pele (queratinócitos da linhagem HaCaT). Os autores concluíram a compatibilidade da nanoformulação com as células, visto que nenhuma alteração foi observada. Além disso, neste trabalho, os autores avaliaram a permeação do imiquimode nas camadas da pele, quando incorporado em diferentes sistemas nanoestruturados (nanocápsulas poliméricas e nanopartículas lipídicas produzidas com lipídios sólidos e líquidos). Foi observado que o fármaco permanecia penetrado na pele, principalmente no estrato córneo em ambos os sistemas produzidos. Além disso, DIAS e colaboradores (2018) avaliaram a atividade antitumoral do imiquimode nanoencapsulado *in vivo* (carcinogênese de pele em ratos). Os resultados obtidos mostraram que a nanoencapsulação do imiquimode foi capaz de potencializar sua atividade antitumoral, visto que o imiquimode nanoencapsulado diminuiu mais o número e tamanho dos tumores do que as nanocapsulas sem fármaco e o creme comercial de imiquimode. No entanto, não foram desenvolvidos sistemas semissólidos visando aplicação tópica nestes dois estudos. Visto que as nanocápsulas poliméricas são obtidas como uma suspensão aquosa, sua incorporação em um veículo semissólido é necessária para aplicação tópica. Posteriormente, FRANK e colaboradores (2017) compararam a adesividade, em mucosa vaginal suína, do imiquimode não encapsulado, nanocápsulas poliméricas contendo imiquimode e as nanocápsulas incorporadas em um veículo semissólido (hidrogel de quitosana). Os autores observaram que a suspensão de nanocápsulas apresentava-se mais adesiva na mucosa do que a formulação com o fármaco livre, e essa adesividade foi aumentada quando as nanocápsulas foram incorporadas no hidrogel.

No presente estudo, a suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo imiquimode foi incorporada em um veículo semissólido à base de pectina com o objetivo de proporcionar o tempo de contato adequado entre a formulação e a pele. A pectina é um polímero natural, formado por uma mistura de polissacarídeos em cadeia linear (SRIAMORNSAK, 2003). Sua estrutura química, representada na figura 3, consiste em unidades de ácido (1-4)- α -D-galacturônico e unidades de (1-2)- α -L-ramnose, entre outros açúcares (galactose, arabinose e xilose) (SRIAMORNSAK, 2003; THIRAWONG et al., 2008). A origem da pectina e o método de extração utilizado podem influenciar na sua estrutura, levando a variações no peso molecular e no grau de esterificação (SRIAMORNSAK, 2003). O grau de esterificação (GE) é determinado pela quantidade de unidades de ácido D-galacturônico esterificadas em relação ao total de unidades. A pectina pode ser classificada em alto GE (60-75%), a qual forma gel em condições de pH mais baixo (em torno de três), e baixo GE (20-40%), a qual necessita de uma determinada quantidade de cálcio (ou outro íon divalente) para formação de gel (SRIAMORNSAK, 2003).

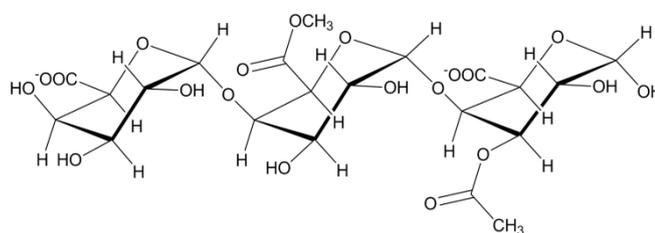


Figura 3. Estrutura química da pectina

Apesar de ser encontrada na parede celular de quase todas as plantas, a pectina comercial é extraída majoritariamente de maçãs e cascas de frutas cítricas (SRIAMORNSAK, 2003). Este polímero é amplamente utilizado na indústria de alimentos, como agente espessante e gelificante, sendo, portanto, segura para uso humano. A pectina também apresenta inúmeras aplicações no setor farmacêutico, como por exemplo, no tratamento de pacientes com sobrepeso (DI LORENZO et al., 1988; JIANG et al., 2016) e como estratégia para redução do colesterol (BROUNS et al., 2012).

Estudos na literatura avaliaram o uso deste polímero em sistemas de liberação controlada de fármacos para administração oral (ASHFORD et al., 1994;

FERNANDEZ-HERVAS et al., 1998). Além disso, THIRAWONG e colaboradores (2007) avaliaram a adesividade deste polímero em diferentes partes do trato gastrointestinal (mucosa bucal, estômago e intestino). Os autores utilizaram pectinas com graus de esterificação e pesos moleculares distintos e compararam com Carbomer 934P. Observou-se que a pectina (alto e baixo GE) apresentou maior adesividade, exceto na mucosa estomacal, do que o Carbomer 943P. Os autores também concluíram que a mucoadesividade da pectina está relacionada com suas características estruturais, visto que pectinas de maior GE e peso molecular apresentaram maior adesão. Considerando as características acima expostas, a presente dissertação de mestrado teve o objetivo de desenvolver e avaliar a eficácia de uma formulação a base de pectina contendo imiquimode nanoencapsulado visando ao tratamento do câncer de pele do tipo melanoma. O objetivo foi validar as seguintes hipóteses: (1) o imiquimode nanoencapsulado apresenta maior efeito citotóxico em células tumorais em comparação com o fármaco não encapsulado; (2) o hidrogel de pectina contendo o imiquimode nanoencapsulado apresenta alta adesividade na pele e é capaz de modular a penetração do fármaco na pele.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar hidrogel de pectina (3%) contendo nanocápsulas poliméricas de imiquimode visando ao tratamento do câncer de pele.

2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar a revisão da literatura a respeito do uso da pectina no setor farmacêutico;
- b) Realizar a revisão da literatura a respeito do uso de nanopartículas como sistemas carreadores de fármacos e as técnicas empregadas para caracterização dessas formulações;
- c) Preparar e caracterizar a suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo imiquimode quanto ao teor, tamanho, potencial zeta e pH;
- d) Avaliar a citotoxicidade das nanocápsulas poliméricas em células de melanoma (SK-MEL-28);
- e) Preparar e caracterizar o gel de pectina (3%) contendo a suspensão de nanocápsulas poliméricas quanto ao teor, tamanho, pH, comportamento reológico e morfologia (microscopia eletrônica de varredura);
- f) Avaliar o perfil de liberação do fármaco nanoencapsulado a partir do hidrogel de pectina;
- g) Avaliar a permeação e penetração do fármaco imiquimode nanoencapsulado e incorporados no hidrogel de pectina em modelo de pele suína;
- h) Avaliar a adesividade do hidrogel de pectina contendo o imiquimode nanoencapsulado utilizando pele suína pelas técnicas de lavabilidade e análise de tensão.

ENCARTES DE PUBLICAÇÃO

Durante o período de mestrado foi realizada pesquisa bibliográfica completa e atualizada acerca dos temas abordados neste projeto. Inicialmente, a revisão da literatura relacionada ao uso da pectina para o desenvolvimento de formulações visando ao tratamento do câncer foi realizada, e observou-se um número expressivo de trabalhos que utilizou esse polímero para entrega direcionada de fármacos antitumorais para tratamento do câncer colorretal. A análise dos estudos sobre este tema em específico resultou em um artigo (*short communication*), apresentado no capítulo 1 desta dissertação. Estes trabalhos mostraram que o uso da pectina para o desenvolvimento de formulações projetadas para administração oral é vantajoso. No entanto, a utilização deste polímero para entrega de fármacos pela via tópica em associação com nanocarreadores não foi encontrada, o que incentivou a investigação a respeito desta aplicação.

Além disso, foram redigidos três capítulos do livro “The ADME Encyclopedia”, sob edição do Prof. Dr. Alan Talevi. O desenvolvimento destes capítulos proporcionou o aprofundamento dos conhecimentos teóricos a respeito da nanotecnologia e sua aplicação na área farmacêutica. Estes três capítulos produzidos estão apresentados no capítulo 2, capítulo 3 e apêndice desta dissertação.

A parte experimental do trabalho incluiu a produção, caracterização físico-química e avaliação da citotoxicidade em linhagem de células de melanoma de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo o antitumoral imiquimode. Posteriormente, as nanocápsulas poliméricas contendo este fármaco foram empregadas para o desenvolvimento de uma formulação semissólida a base de pectina com o objetivo de obter uma formulação tópica apropriada para o tratamento do melanoma. A caracterização físico-química do hidrogel desenvolvido foi realizada. Além disso, a capacidade deste veículo de modular a penetração do fármaco na pele também foi avaliada. Os resultados obtidos, apresentados no capítulo 4 desta dissertação, demonstraram que a formulação inovadora desenvolvida apresenta-se como um potencial tratamento tópico para o melanoma.

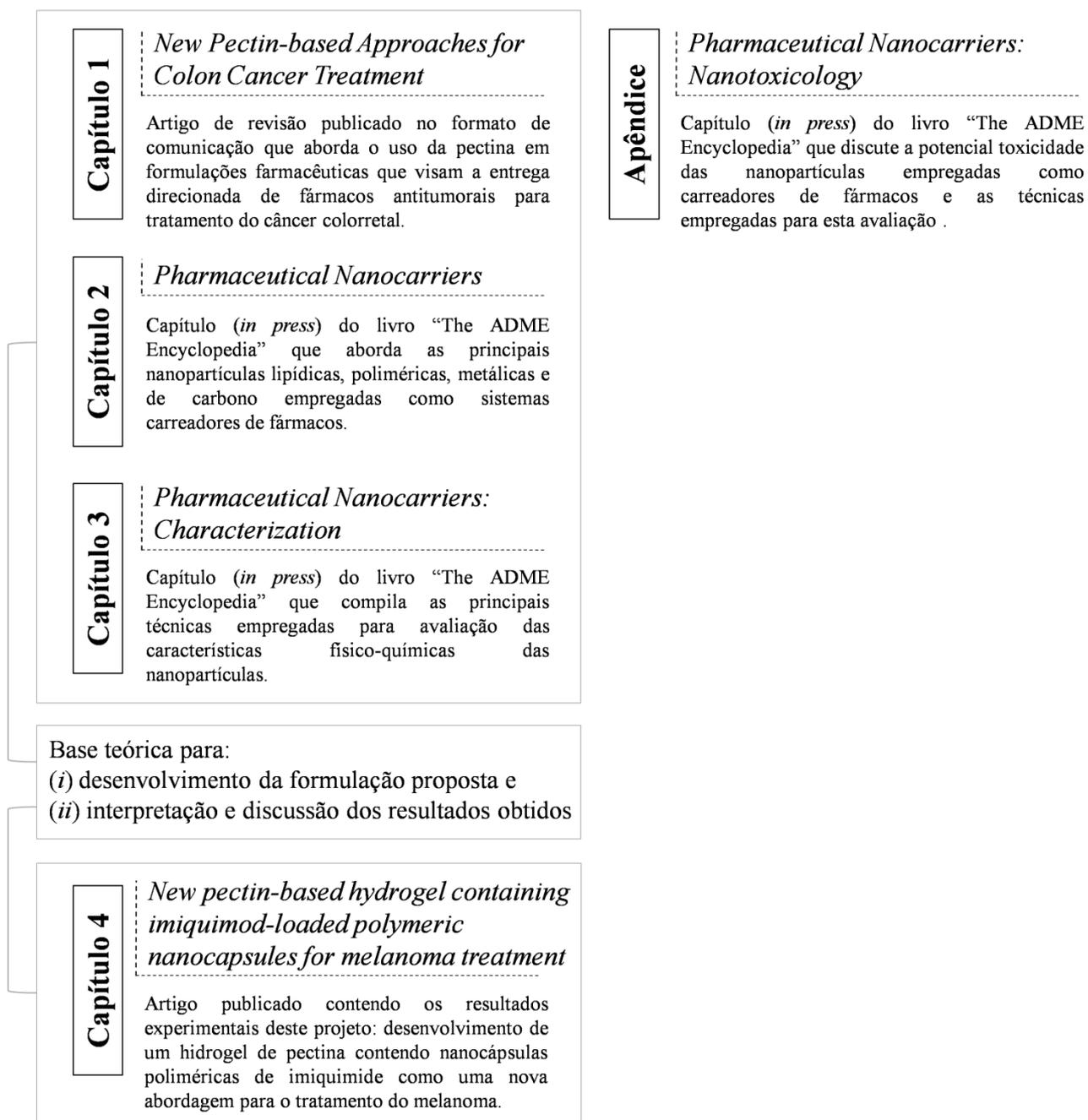


Figura 4 – Figura esquemática do conteúdo teórico e experimental que será apresentado e discutido nos capítulos e no apêndice desta dissertação.

CAPÍTULO 1

A revisão da literatura acerca do uso da pectina para o desenvolvimento de formulações visando ao tratamento do câncer colorretal resultou em um artigo intitulado “*New Pectin-based Approaches for Colon Cancer Treatment*” publicado no periódico *EC Pharmacology and Toxicology*.

O Capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 37 – 41.

Dr. Frank LA., et al. “New Pectin-based Approaches for Colon Cancer Treatment”.
EC Pharmacology and Toxicology SI.02 (2020): 07-09.

CAPÍTULO 2

O livro "The ADME Encyclopedia", da editora Springer, sob edição do Prof. Dr. Alan Talevi, atualmente *in press*, contém uma sessão exclusiva de nanotecnologia, na qual o uso dessa tecnologia em aplicações farmacêuticas é abordado. Eu participei da elaboração, como autora principal, dos três primeiros capítulos desta sessão. O primeiro deles, intitulado "Pharmaceutical nanocarriers", discute os diferentes tipos de nanopartículas empregadas como carreadores de fármacos. Este capítulo foi dividido em três partes. A primeira delas descreveu as principais nanopartículas lipídicas (lipossomas, cubossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados). A segunda parte descreveu as principais nanopartículas poliméricas (micelas poliméricas, nanoesferas, nanocápsulas poliméricas e nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico). A última parte deste capítulo descreveu as principais nanopartículas inorgânicas empregadas como nanocarreadores farmacêuticos (nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de ferro, nanopartículas de carbono e nanopartículas de sílica.). As formulações comercialmente disponíveis que contêm essas nanopartículas também foram abordadas.

A última versão submetida deste capítulo está disponível abaixo para leitura:

O Capítulo 2 é constituído por capítulo de livro (*in press*), que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 47 – 71.

CAPÍTULO 3

O segundo capítulo da sessão de nanotecnologia do livro “The ADME Encyclopedia”, intitulado "Pharmaceutical nanocarriers characterization", discute as principais técnicas empregadas para caracterização físico-química dos nanocarreadores. Este capítulo descreveu, inicialmente, técnicas empregadas para avaliação da morfologia das partículas (microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espalhamento de raio-X). Técnicas empregadas para determinação do tamanho de partícula (espalhamento de luz dinâmico, difração a laser e análise de rastreamento de nanopartículas) e a técnica para análise do potencial zeta também foram descritas. Posteriormente, os principais métodos de quantificação empregados para determinação do teor e da eficiência de encapsulação foram abordados. Além disso, técnicas empregadas para avaliação de interações intramoleculares foram descritas. Por fim, incluímos brevemente como é realizada a avaliação da estabilidade desses nanocarreadores e do perfil de liberação dos ativos a partir das partículas.

A última versão submetida deste capítulo está disponível abaixo para leitura:

O Capítulo 3 é constituído por capítulo de livro publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 77 – 92.

Gazzi R.P., Contri R.V., Pohlmann A.R., Guterres S.S., Frank L.A. (2021) Pharmaceutical Nanocarrier Characterization. In: Talevi A. (eds) The ADME Encyclopedia. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51519-5_105-1

CAPÍTULO 4

Os resultados da parte experimental realizada, que incluiu o desenvolvimento de uma formulação semissólida a base de pectina contendo nanocápsulas poliméricas de imiquimode para o tratamento do melanoma, estão apresentados na forma de um artigo publicado no periódico *Drug Delivery and Translational Research* (DOI: 10.1007/s13346-020-00805-5).

O conteúdo deste artigo está disponível abaixo para leitura:

O Capítulo 4 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 97 – 123.

Gazzi R.P., Frank L.A., Onzi G., Pohlmann A.R., Guterres S.S. (2020). New pectin-based hydrogel containing imiquimod-loaded polymeric nanocapsules for melanoma treatment. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(6), 1829-1840. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00805-5>

DISCUSSÃO GERAL

A revisão da literatura sobre o uso da pectina no setor farmacêutico teve o objetivo de proporcionar o aprofundamento do conhecimento a respeito deste polímero - suas vantagens e aplicações -, e auxiliar no desenvolvimento da formulação proposta e na discussão dos resultados. No entanto, muito além do conhecimento adquirido, identificamos uma lacuna existente nas possíveis aplicações da pectina: a associação deste polímero com nanocarreadores para aplicação tópica. A falta de informação a respeito deste tema incentivou nossa investigação acerca (i) do potencial de formulações a base de pectina para entrega de fármacos por via tópica e (ii) da influência que a incorporação de nanocarreadores teria no desempenho dessas formulações.

Considerando o aprofundamento teórico sobre as nanopartículas e seu uso como sistemas carreadores de fármacos, esta dissertação apresenta dois capítulos de livro que oferecem suporte para interpretação e discussão dos resultados obtidos na parte experimental deste projeto. Nestes capítulos, os principais tipos de nanopartículas orgânicas e inorgânicas utilizadas como carreadores de fármacos foram descritas. Além disso, comparamos os tipos de técnicas de caracterização físico-química de nanopartículas, muitas das quais utilizamos para caracterização formulação desenvolvida neste trabalho: microscopia eletrônica de varredura, difração de laser, espalhamento de luz dinâmico, potencial zeta, cromatografia e técnicas para avaliação de estabilidade. Após desenvolver os capítulos deste livro, foi possível identificar uma das principais, se não a principal, aplicações de nanopartículas empregadas como carreadores de fármacos: o tratamento do câncer. Diversas são as vantagens que as nanopartículas apresentam quando empregadas como carreadores de fármacos antitumorais: liberação do fármaco de forma controlada, diminuição de efeitos adversos, diminuição de dose, entrega direcionada do fármaco, entre outras. Tendo em mente as vantagens que formulações de base nanotecnológica podem proporcionar na terapêutica do câncer, desenvolvemos a presente pesquisa experimental buscando uma nova estratégia para o tratamento do melanoma.

O melanoma é um tipo de câncer que apresenta alta taxa de mortalidade. Apesar de esta doença ser mais comumente diagnosticada em adultos e idosos, ela tem atingido cada vez mais a população jovem. A predisposição genética e alta

exposição à radiação UV são os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento do melanoma. O prognóstico da doença é mais alto se diagnosticada precocemente, pois menores são as chances de metástase e maiores são as chances de remissão completa do tumor após o tratamento. O estágio no qual a doença se encontra irá influenciar na escolha do tratamento. Nos estágios mais avançados, indica-se quimioterapia e/ou imunoterapia. Nos estágios iniciais, a remoção cirúrgica da lesão, por vezes associada com radioterapia, é indicada. No entanto, existem casos em que a excisão cirúrgica não é recomendada (por exemplo, quando há comprometimento funcional e/ou estético ou por opção do paciente). O tratamento com formulações tópicas apresenta-se como uma alternativa à remoção cirúrgica ou como uma terapia adjuvante (visto que pode auxiliar na eliminação de células tumorais remanescentes após excisão da lesão). Não existem, atualmente, formulações tópicas comercialmente disponíveis para o tratamento do melanoma, e diversos podem ser os motivos para isso, por exemplo: dificuldade de penetração do fármaco na pele para atingir as células tumorais e efeitos adversos intensos ocasionados pelo tratamento. No entanto, a importância de existir tal tipo de tratamento é evidenciada pelos estudos clínicos que investigam a eficácia de tratamentos tópicos, incluindo com o imiquimode, para o melanoma (www.clinicaltrials.gov, acessado em 06 de abril de 2021). Por outro lado, após pesquisa no site citado, não foram encontrados estudos clínicos que avaliem formulações tópicas de base nanotecnológica para o tratamento deste tipo de câncer. O foco deste trabalho foi então suprir esta lacuna existente nas opções de tratamento do melanoma através do desenvolvimento de uma nova formulação que associa o antitumoral imiquimode, as nanocápsulas poliméricas e o polímero pectina possibilitando assim uma nova abordagem terapêutica.

A primeira etapa deste trabalho incluiu a produção da suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo imiquimode (NCimiq) conforme metodologia descrita no trabalho de FRANK e colaboradores (2017), e os resultados obtidos foram similares àqueles previamente descritos. Após a caracterização físico-química das nanocápsulas poliméricas, a citotoxicidade da formulação foi avaliada em linhagem de células de melanoma (SK-MEL), em comparação com o imiquimode livre (Imiq) e nanocápsulas sem fármaco (NC). Observamos um efeito

tempo-dependente para NCimiq, e o efeito citotóxico nas células tratadas com o fármaco nanoencapsulado foi mais expressivo do que nas células tratadas com Imiq. Este resultado era esperado, visto que trabalhos na literatura mostram que fármacos nanoencapsulados são mais citotóxicos para células tumorais do que o fármaco não encapsulado (BONDI et al., 2007, PAOLINO et al., 2013; FRANK et al., 2017, FRANK et al., 2019). Além disso, os resultados obtidos nos permitiram concluir que o efeito citotóxico apresentado por NCimiq é devido à nanoencapsulação deste fármaco, pois as formulações Imiq e NC apresentaram potência inferior a NCimiq em 48 e 72 horas. A diminuição da viabilidade celular utilizando uma baixa concentração de imiquimode nas nanocápsulas é também importante de ser mencionada. Este resultado é devido à nanoencapsulação do ativo, visto que trabalhos da literatura que avaliaram o imiquimode em células tumorais utilizaram concentrações mais altas de fármaco para obtenção de resultados similares (HUANG et al., 2010, KIM et al., 2010). A maior potência apresentada pelo fármaco nanoencapsulado está relacionada com a maior interação que as nanoestruturas apresentam com as células e com a liberação controlada do fármaco.

Após comprovação do efeito citotóxico das nanocápsulas poliméricas de imiquimode em células de melanoma, a segunda etapa deste trabalho incluiu o desenvolvimento de um hidrogel de pectina com a suspensão de nanocápsulas (PEC-NCimiq), originando uma formulação inovadora para administração tópica. A presença das nanocápsulas poliméricas intactas no hidrogel de pectina foi confirmada pelas técnicas de difração de laser e microscopia eletrônica de varredura. Em relação à distribuição de tamanho das partículas, o perfil apresentado pelas nanocápsulas em suspensão e pelas nanocápsulas incorporadas no hidrogel foi semelhante. A viscosidade desta formulação foi avaliada e observou-se comportamento pseudoplástico, o qual é ideal para um espalhamento fácil e uniforme do produto (OLIVEIRA et al., 2014).

O perfil de liberação do imiquimode a partir de PEC-NCimiq foi avaliado, visto que a liberação do fármaco de forma controlada pode contribuir para diminuição dos efeitos adversos. Nós observamos que a formulação PEC-NCimiq foi capaz de controlar a liberação do imiquimode de forma mais efetiva que o hidrogel de

pectina contendo o fármaco não encapsulado (PEC-imiq). O uso da pectina para controlar a liberação de fármacos já foi reportado (ASHFORD et al., 1994, BARACAT et al., 2012, PREZZOTI et al., 2014), porém sua associação com a nanotecnologia proporcionou um efeito mais sustentado.

Para que o tratamento tópico do melanoma seja eficaz é necessário que o fármaco permeie até a derme, visto que é a camada da pele onde as células cancerígenas estão localizadas. Os resultados obtidos demonstraram que, em associação com o hidrogel de pectina, a nanoencapsulação do fármaco não apenas aumentou a quantidade de fármaco permeado como também tornou a permeação através da pele mais rápida. Ainda não existem estudos na literatura que expliquem o mecanismo pelo qual a pectina modula a permeação de substâncias por via tópica. No entanto, os resultados obtidos neste experimento nos levam a apoiar esta hipótese, já que tanto o fármaco incorporado em PEC-NCimiq quanto em PEC-imiq penetraram na derme. A vantagem do uso da nanotecnologia é confirmada pela maior quantidade de imiquimode penetrado na derme quando este foi nanoencapsulado. Outro fator que corrobora a hipótese de que a pectina é capaz de modular a permeação de ativos através da pele é a comparação dos nossos resultados com os resultados de permeação obtidos por VENTURINI e colaboradores (2015) empregando a suspensão de nanocápsulas de imiquimode. Os autores observaram que o fármaco nanoencapsulado em suspensão penetrou principalmente no estrato córneo, enquanto que nossos resultados mostraram que o hidrogel de pectina permitiu uma maior penetração do imiquimode nanoencapsulado na derme.

Considerando a via de administração da formulação proposta, é também importante que ela seja adesiva para garantir o tempo adequado de contato do fármaco com o local de ação. Os resultados obtidos pelo estudo de lavabilidade mostraram que as nanocápsulas poliméricas aumentaram a adesão do hidrogel de pectina na pele, visto que o fármaco incorporado em PEC-NCimiq foi menos lavado da pele do que o fármaco incorporado em PEC-imiq. Este resultado corrobora com o de estudos anteriores, os quais demonstraram a capacidade das nanocápsulas poliméricas de aumentar a adesividade hidrogéis na pele (CONTRI et al., 2014). O estudo de análise de tensão também foi realizado para avaliar a

adesividade dos hidrogéis de pectina na pele; no entanto, os resultados obtidos mostraram valores similares para PEC-NCimiq e PEC-imiq. A diferença de resultados obtidos pelos dois experimentos pode ser devido à presença de um fluxo contínuo no estudo de lavabilidade.

Analisando os resultados encontrados para o hidrogel de pectina contendo nanocápsulas poliméricas de imiquimode, concluímos que tal formulação tem potencial de ser utilizada para o tratamento tópico do melanoma. As características de liberação controlada do fármaco, capacidade de penetração na derme e adesividade tornam PEC-NCimiq um candidato promissor para o tratamento desta doença. Além disso, a associação da pectina com a nanotecnologia pode ser utilizada como estratégia para o tratamento de outras doenças que necessitam de tratamento tópico.

CONCLUSÃO

A produção teórica desenvolvida durante o período de mestrado contribuiu não apenas para o aprofundamento do conhecimento sobre os assuntos abordados no projeto, mas também para ampliar e aperfeiçoar a literatura disponível a respeito do tema. Através dos capítulos produzidos, compilamos de forma sistematizada os principais tipos de nanopartículas, tanto orgânicas quanto inorgânicas, empregadas como carreadores de fármacos, e quais técnicas são empregadas para avaliar as características físico-químicas desses nanocarreadores.

A investigação acerca da ação do imiquimode em linhagem de células de melanoma mostrou que o fármaco nanoencapsulado apresentou maior efeito citotóxico em comparação com o fármaco não encapsulado. Os resultados promissores obtidos em cultura de células levaram-nos a propor uma formulação nanotecnológica inovadora de aplicação tópica para o tratamento do melanoma. O hidrogel desenvolvido, o qual associa pectina e a suspensão de nanocápsulas poliméricas de imiquimode, foi capaz de controlar a taxa de liberação do fármaco, característica importante visto que pode contribuir para diminuição dos efeitos adversos causados pelo imiquimode. O hidrogel de pectina também foi capaz de modular a permeação do imiquimode nanoencapsulado através da pele. O fármaco penetrou em todas as camadas da pele, principalmente na derme, a camada mais profunda. A importância destes resultados se deve à dificuldade de permeação de substâncias através da pele devido à complexa organização desta barreira. Além disso, devido à baixa taxa de remoção do fármaco da pele, foi possível concluir que a formulação desenvolvida possui alta adesividade. Os resultados aqui apresentados mostram que a formulação proposta apresenta-se como uma alternativa para o tratamento do melanoma, visto que é necessário que o fármaco consiga atingir a camada mais profunda da pele, pois é onde estão localizadas as células cancerígenas, bem como é necessário aplicar formulações adesivas para garantir o tempo de contato adequado do fármaco com a pele. Estudos *in vitro* adicionais e estudo *in vivo* são necessários para elucidar de forma completa o potencial desta inovadora formulação.

PERSPECTIVAS PARA FUTURAS PESQUISAS

Para avaliar a segurança desta formulação e determinar sua eficácia para o tratamento do melanoma são necessários estudos *in vitro* adicionais e estudos *in vivo*.

Estudos *in vitro*:

- Het-Cam

Estudos *in vivo*:

- *Caenorhabditis elegans*
- Modelo de melanoma murino

REFERÊNCIAS

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf> Acesso em 17 de março de 2021.

ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. **Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers.** Int. J. Pharm, v.341, p. 215-220, 2007.

ASHFORD, M.; FELL, J.; ATTWOOD, D.; SHARMA, H.; WOODHEAD, P. **Studies on pectin formulations for colonic drug delivery.** Journal of Controlled Release, v. 30(3), p. 225-232, 1994.

ASPORD, C.; TRAMCOURT, L.; LELOUP, C.; MOLENS, J.P.; LECCIA, M.T.; CHARLES, J.; PLUMAS, J. **Imiquimod inhibits melanoma development by promoting pDC cytotoxic functions and impeding tumor vascularization.** Journal of investigative dermatology, v. 134(10), p. 2551-2561, 2014.

BARACAT, M.M.; NAKAGAWA, A.M.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A.; FREITAS, O. **Preparation and characterization of microcapsules based on biodegradable polymers: Pectin/casein complex for controlled drug release systems.** AAPS pharmscitech, v. 13, n. 2, p. 364-372, 2012.

BONDÌ, M.L.; CRAPARO, E.F.; GIAMMONA, G.; CERVELLO, M.; AZZOLINA, A.; DIANA, P.; MARTORANA, A.; CIRRINCIONE, G. **Nanostructured lipid carriers containing anticancer compounds: preparation, characterization, and cytotoxicity studies.** Drug Delivery, v. 14, n. 2, p. 61-67, 2007.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R.L.; TORRE, L.A.; JEMAL, A. **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** CA: a cancer journal for clinicians, v. 68(6), p. 394-424, 2018.

BROUNS, F.; THEUWISSEN, E.; ADAM, A.; BELL, M.; BERGER, A.; MENSINK, R.P. **Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women.** European journal of clinical nutrition, v. 66, n. 5, p. 591-599, 2012.

BURNS, C.A.; BROWN, M.D. **Imiquimod for the treatment of skin cancer**. *Dermatologic Clinics*, v. 23(1), p. 151-164, 2005.

clinicaltrials.gov/ct2/results?recrs=&cond=Melanoma&term=imiquimod&cntry=&state=&city=&dist= Acesso em 06 de abril de 2021.

CONTRI, R.V.; FRANK, L.A.; KAISER, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. **The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids**. *International journal of nanomedicine*, v. 9, p. 951, 2014.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.;LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. **Nanocapsule technology: a review**. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carriers Systems*,v.19, p. 99–134, 2002.

CRAYTHORNE, E.; AL-NIAMI, F. **Skin cancer**. *Medicine*,v.45(7), p. 431-434, 2017.

DIAS, Marina França et al. In vivo evaluation of antitumoral and antiangiogenic effect of imiquimod-loaded polymeric nanoparticles. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1107-1114, 2018.

DI LORENZO, C.; WILLIAMS, C.M.; HAJNAL, F.; VALENZUELA, J.E. **Pectin delays gastric emptying and increases satiety in obese subjects**. *Gastroenterology*,v.95, p. 1211-1215, 1988.

DOMINGUES, B.; LOPES, J.M.; SOARES, P.; PÓPULO, H. **Melanoma treatment in review**. *ImmunoTargets and therapy*, v. 7, p. 35, 2018.

ESTEVA, A.; KUPREL, B.; NOVOA, R.A.; KO, J.; SWETTER, S.M.; BLAU, H.M.; THRUN, S. **Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks**. *Nature*, v. 542(7639), p. 115-118, 2017.

FERNANDEZ-HERVAS, M.J.; FELL, J.T. **Pectin/chitosan mixtures as coatings for colon-specific drug delivery: an in vitro evaluation**. *International journal of pharmaceuticals*, v. 169(1), p. 115-119, 1998.

FRANK, L.A.; CHAVES, P.S.; D'AMORE, C.M.; CONTRI, R.V.; FRANK, A.G.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; BUFFON, A.; GUTERRES, S.S. **The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutica*, v. 114, p. 202-212, 2017.

- FRANK, L.A.; GAZZI, R.P.; DE ANDRADE MELLO, P.; BUFFON, A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. **Imiquimod-loaded nanocapsules improve cytotoxicity in cervical cancer cell line.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 136, p. 9-17, 2019.
- FRANK, L.A.; GAZZI, R.P.; MELLO, P.A.; CHAVES, P.; PEÑA, F.; BECK, R.C.R.; BUFFON A.; POHLMANN A.R.; GUTERRES, S.S. **Anti-HPV Nanoemulsified-Imiquimod: A New and Potent Formulation to Treat Cervical Cancer.** *AAPS PharmSciTech*, v. 21(2), p. 54, 2020.
- GUPTA, A.K.; BROWNE, M.; BLUHM, R. **Imiquimod: a review.** *Journal of cutaneous medicine and surgery*, v.6 (6), p. 554-560, 2002.
- HUANG, S.W.; LIU, K.T.; CHANG, C.C.; CHEN, Y.J.; WU, C.Y.; TSAI, J.J.; LU, W.C.; WANG, Y.T.; LIU, C.M.; SHIEH, J.J. **Imiquimod simultaneously induces autophagy and apoptosis in human basal cell carcinoma cells.** *British Journal of Dermatology*, v. 163, n. 2, p. 310-320, 2010.
- JIANG, T.; GAO, X.; WU, C.; TIAN, F.; FEI, Q.; BI, J.; XIE, B.; WANG, H.Y.; CHEN, S.; WANG, X. **Apple-derived pectin modulates gut microbiota, improves gut barrier function, and attenuates metabolic endotoxemia in rats with diet-induced obesity.** *Nutrients*, v. 8, n. 3, p. 126, 2016.
- KIM, C.H.; AHN, J.H.; KANG, S.U.; HWANG, H.S.; LEE, M.H.; PYUN, J.H.; KANG, H.Y. **Imiquimod induces apoptosis of human melanocytes.** *Archives of dermatological research*, v. 302, n. 4, p. 301-306, 2010.
- KREUTER, A.; POTTHOFF, A.; BROCKMEYER, N.H.; GAMBICHLER, T.; STÜCKER, M.; ALTMAYER, P.; SWOBODA, J.; PFISTER, H.; WIELAND, U. **Imiquimod leads to a decrease of human papillomavirus DNA and to a sustained clearance of anal intraepithelial neoplasia in HIV-infected men.** *J Invest Dermatol*, v.128, p. 2078-2083, 2008.
- MISHRA, H.; MISHRA, P.K.; EKIELSKI, A.; JAGGI, M.; IQBAL, Z.; TALEGAONKAR, S. **Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology.** *Journal of cancer research and clinical oncology*, v. 144(12), p. 2283-2302, 2018.
- NAYLOR, M.F.; CROWSON, N.; KUWAHARA, R.; TEAGUE, K.; GARCIA, C.; MACKINNIS, C.; HAQUE R.; ODOM C.; JANKEY C.; CORNELISON, R.L.

Treatment of lentigo maligna with topical imiquimod. British Journal of Dermatology, v. 149, p. 66-69, 2003.

OLIVEIRA, M.B.; PRADO, A.H.D.; BERNEGOSSI, J.; SATO, C.S.; BRUNETTI, I.L.; SCARPA, M.V.; CHORILLI, M. **Topical application of retinyl palmitate-loaded nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of skin aging.** BioMedresearchinternational, v. 2014, 2014.

PAOLINO, D.; COSCO, D.; CELANO, M.; MORETTI, S.; PUXEDDU, E.; RUSSO, D.; FRESTA, M. **Gemcitabine-loaded biocompatible nanocapsules for the effective treatment of human cancer.** Nanomedicine, v. 8(2), p. 193-201, 2013.

PREZOTTI, F.G.; CURY, B.S.F.; EVANGELISTA, R.C. **Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs.** Carbohydratepolymers, v. 113, p. 286-295, 2014.

SCHADENDORF, D.; FISHER, D.E.; GARBE, C.; GERSHENWALD, J.E.; GROB, J.J.; HALPERN, A.; HERLYN, M.; MARCHETT, M.A.; MCARTHUR, G.; RIBAS, A.; ROESCH, A.; HAUSCHILD, A. **Melanoma.** Naturereviewsdiseaseprimer, v.1, p. 15003, 2015.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES SS. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Química Nova, 1-12, 2003.

SRIAMORNSAK, P. **Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review.** SilpakornUniversityInternationalJournal, v. 3, p. 206-228, 2003.

TEIXEIRA, Z.; ZANCHETTA, B.; MELO, B.A.G.; OLIVEIRA, L.L.; SANTANA, M.H.A.; PAREDES-GAMERO, E.J.; JUSTO, G.Z.; NADER, H.B.; GUTERRES, S.S.; DURÁN, N. **Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: Characterization and permeation studies.** Colloids Surf. B: Biointerfaces, v.81, p. 374-380, 2010.

THIRAWONG, N.; NUNTHANID, J.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SRIAMORNSAK, P. **Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: an in vitro evaluation using texture analyzer.** European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 67(1), p. 132-140, 2007.

THIRAWONG, N.; THONGBORISUTE, J.; TAKEUCHI, H.; SRIAMORNSAK, P. **Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin–liposome nanocomplexes.** *J Control Release*, v. 125(3), p. 236-245, 2008.

UROSEVIC, M.; DUMMER, R. **Role of imiquimod in skin cancer treatment.** *American journal of clinical dermatology*, v. 5(6), p. 453-458, 2004.

VENTURINI, C.G.; BRUINSMANN, F.A.; CONTRI, R.V.; FONSECA, F.N.; FRANK, L.A.; D'AMORE, C.M.; RAFFIN, R.P.; BUFFON, A.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. **Co-encapsulation of imiquimod and copaíba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma.** *Eur.J.Pharm.Sci*, v. 79, p. 36-43, 2015.

WIELAND, U.; BROCKMEYER, N.H.; WEISSENBORN S.J.; HOCHDORFER, B.; STÜCKER, M.; SWOBODA, J.; ALTMAYER, P.; PFISTER, H.; KREUTER, A. **Imiquimod treatment of anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive men.** *Arch Dermatol*, V.142, p. 1438-44, 2006.

WOLF, I. H., SMOLLE, J., BINDER, B., CERRONI, L., RICHTIG, E., KERL, H. **Topical imiquimod in the treatment of metastatic melanoma to skin.** *Archives of dermatology*, 139(3), 273-276, 2003.

Figura 1. http://www.oncoguia.org.br/pub/5_tipos_de_cancer/pele2.jpg (acesso em 11/05/2021)

APÊNDICE

O terceiro capítulo da sessão de nanotecnologia do livro “The ADME Encyclopedia”, intitulado "Pharmaceutical nanocarriers: Nanotoxicology", discute a potencial toxicidade das nanopartículas empregadas como carreadores de fármacos e as técnicas empregadas para esta avaliação. Este capítulo foi dividido em duas partes: toxicidade das nanopartículas inorgânicas e toxicidade das nanopartículas orgânicas. A primeira parte descreveu como é realizada a avaliação da toxicidade das principais nanopartículas inorgânicas (descritas no capítulo “Pharmaceutical nanocarriers”) e os resultados obtidos até o momento. A segunda parte deste capítulo descreveu como é avaliada a segurança das nanopartículas poliméricas (nanoesferas, nanocápsulas poliméricas e dendrímeros) e das nanopartículas lipídicas (lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados) empregadas como carreadores de fármacos.

A última versão submetida deste capítulo está disponível abaixo para leitura:

O apêndice é constituído por capítulo de livro publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 153 – 176.

Gazzi R.P., Peruzzi C.P., Flesch I.M., Onzi G., Frank L.A., Garcia S.C. (2021) Pharmaceutical Nanocarriers: Nanotoxicology. In: Talevi A. (eds) The ADME Encyclopedia. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51519-5_106-1

