



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Iontoforese de nanodispersões visando a imunoterapia  
associada à terapia fotodinâmica tópica do melanoma**

**Luciana Facco Dalmolin**

**Ribeirão Preto  
2019**

**LUCIANA FACCO DALMOLIN**

**Iontoforese de nanodispersões visando a imunoterapia associada à  
terapia fotodinâmica tópica do melanoma**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

**Orientadora:** Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 31/05/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto

2019

DALMOLIN,  
L.F.

**Iontoforese de nanodispersões visando a imunoterapia associada à terapia fotodinâmica tópica do melanoma**

DOUTORADO

FCFRPUSP

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dalmolin, Luciana Facco

lontoforese de nanodispersões visando a imunoterapia associada à terapia fotodinâmica tópica do melanoma. Ribeirão Preto, 2019.

137 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Lopez, Renata Fonseca Vianna

1. Nanoemulsão. 2. Melanoma. 3. Terapia Fotodinâmica. 4. Terapia Antiangiogênica. 5. Lontoforese.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Luciana Facco Dalmolin

lontoforese de nanodispersões visando a imunoterapia associada à terapia fotodinâmica tópica do melanoma

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Vitélio e Neli, aos meus irmãos, Nelice e Fabio, e ao meu namorado, Rogério, que são presença viva de Deus em minha vida, por todo incentivo, apoio e principalmente pelo amor incondicional que recebo deles todos os dias.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da minha vida e por ser meu guia e fortaleza em todos os momentos, oferecendo todas as condições indispensáveis para que tudo isso fosse concretizado.

Aos meus pais, pelo amor, compreensão e por terem me ensinado os verdadeiros valores da vida. Por sempre me incentivarem a buscar mais e ir além daquilo que já aprendi, me dando todo o suporte e força para enfrentar os desafios da vida e sair vitoriosa.

Aos meus irmãos Nelice e Fabio que juntamente com meu pai e minha mãe são meu porto seguro e parte do meu coração. Por me proporcionarem muitos momentos de alegria quando conseguíamos estar juntos e que quando longe sempre deram um jeitinho de encurtar a distância e fazer com que eu me sentisse próxima a eles.

Ao meu namorado Rogério que nesse período se tornou meu companheiro de vida, por sempre me ajudar no que precisei além de todo o amor, carinho e admiração que tem por mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, por ter depositado um voto de confiança em mim quando eu vim lhe procurar para a orientação no doutorado, mesmo sem nem saber quem eu era direito. Por acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo de todos estes anos, tanto científicos quanto de vida, além de ser meu exemplo de dedicação, competência e paixão pela ciência.

À técnica do laboratório Patrícia Sper pela disposição em ajudar quando precisei.

Às amigas Day, Fran e Marília que dividiram morada comigo durante os anos do doutorado e foram minha segunda família em Ribeirão. Obrigada por toda a paciência e boas risadas que demos juntas.

Às minhas queridas amigas de laboratório e da vida: Camila Lemos, Bianca Martins, Francieli Pereira, Camila Cubayachi e Danielle Nishida por toda ajuda e por fazerem da rotina pesada algo mais leve.

À toda equipe NanoTop: Yomi, Talita, Gabi, Paula, Íris, Yugo, Cynthia, Karina, Pati Mazureki, Dani Bernardi, Raquel, Isabela e Júlia.

Às alunas de iniciação científica Marcela e Mariane, que tive o prazer de co-orientar durante o doutorado e com as quais tive a oportunidade de ensinar e aprender durante o desenvolvimento do projeto, contribuindo para meu crescimento profissional.

Ao professor Prof. Dr. Roberto Santana por disponibilizar o uso do espectrofluorímetro em seu laboratório e à técnica Ju pela ajuda.

Ao professor Prof. Dr. Cláudio Tedesco e ao técnico Henrique que deram todo o suporte com os experimentos de TFD *in vivo*, disponibilizando o uso do laser necessário e do laboratório de animais.

Ao professor Prof. Dr. Eduardo Milani Rocha por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização das análises histológicas, ao professor patologista Fernando Chahud pelo auxílio na análise e interpretação dos cortes histológicos e especialmente as técnicas Adriana e Marina da Casa 19 por toda a ajuda com o processamento das amostras e confecção das lâminas.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Vitória Lopes Badra Bentley pelo empréstimo do equipamento NTA. Ao técnico José Orestes Del Ciampo pelo auxílio nas leituras.

À empresa Lipid Ingredients & Technology, por gentilmente doar matérias-primas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos Eduardo Tozatto e Fabiana da FCFR-RP, José Augusto e Tuca da FMRP-RP pelo suporte nas análises em microscopia de confocal de varredura à laser, citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Reinaldo, Fabio e Ronaldo, pela disponibilidade e ajuda no cuidado com os animais utilizados no experimento *in vivo*.

Ao Vitor e ao Yomi que me auxiliaram em todo o experimento *in vivo* no manuseio dos animais.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por proporcionar todos os meios e recursos de aprendizado e desenvolvimento desse projeto de pesquisa e do curso de doutorado. Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana Florêncio, pela gentileza, e colaboração durante o período da pós-graduação.



Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) (número de processo 141122/2015-3) pela concessão de bolsa e auxílio financeiro à pesquisa e desenvolvimento desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo apoio financeiro à pesquisa e desenvolvimento desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do projeto temático (número de processo 2014/22451-7), sem o qual este e outros trabalhos não poderiam ter sido desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa, um profundo e imenso agradecimento.

*“De tudo ficaram três coisas:  
A certeza de que estamos começando,  
A certeza de que é preciso continuar e  
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.  
Fazer da interrupção um caminho novo,  
Fazer da queda um passo de dança,  
Do medo uma escola,  
Do sonho uma ponte,  
Da procura um encontro,  
E assim terá valido a pena existir!”*

Fernando Sabino

## RESUMO

DALMOLIN, Luciana Facco. **Iontoforese de nanodispersões visando a imunoterapia associada à terapia fotodinâmica tópica do melanoma**. 2019. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A associação da terapia fotodinâmica (TFD) e da imunoterapia foi a estratégia investigada neste trabalho para o tratamento tópico do melanoma. Para viabilizar a administração do fotossensibilizante lipofílico usado na TFD, a zinco ftalocianina (ZnF), na mesma formulação que o anticorpo monoclonal anti-fator de crescimento endotelial vascular, o bevacizumabe, foi desenvolvida uma nanoemulsão. A influência da nanoemulsão contendo os fármacos na cito e fototoxicidade de células de melanoma e na inibição da proliferação de células do endotélio foi verificada *in vitro*. A influência da iontoforese da nanoemulsão na permeação cutânea desses fármacos e distribuição nas células tumorais foi investigada *in vitro*, em pele de porco, e *in vivo* em melanoma induzido em camundongo. Neste último, a eficiência da TFD e da imunoterapia no crescimento tumoral e na metástase foi investigada após administração via intratumoral e tópica por iontoforese da nanoemulsão. A nanoemulsão O/A desenvolvida apresentou-se estável frente a aplicação da corrente elétrica, capacidade de solubilizar mais de 40 µg/mL da ZnF e de diminuir a agregação da ZnF em meio biológico. Em células de melanoma B16F10, a ZnF mostrou maior potencial fototóxico quando incorporada na nanoemulsão do que quando em solução, apresentando IC<sub>50</sub> de 192±6 ng/mL após irradiação, sendo que em associação ao bevacizumabe foi observada uma redução nesse valor para 56±7 ng/mL. Além disso, a nanoemulsão foi capaz de aumentar em 4 vezes o *uptake* celular da ZnF quando comparado à solução. O potencial anti-angiogênico do bevacizumabe incorporado na nanoemulsão, avaliado em células endoteliais CRL-2922, foi confirmado pela sua capacidade de inibir a migração celular de forma mais efetiva do que o fármaco em solução após 24 h de tratamento. *In vitro*, a nanoemulsão aumentou a penetração da ZnF na pele quando comparada a uma emulsão de composição idêntica. Na presença de apenas 30 min de iontoforese, a nanoemulsão aumentou em quase 16 vezes a penetração da ZnF nas camadas mais profundas da pele quando comparada a iontoforese da emulsão. *In vivo*, este período de aplicação permitiu que a ZnF alcançasse o melanoma induzido sob a pele de camundongos C57BL6. O tratamento desse tumor por via intratumoral e iontoforética com a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe seguido da TFD diminuiu em aproximadamente 8 vezes o crescimento tumoral em relação ao controle. A aplicação tópica com iontoforese se mostrou tão ou mais efetiva do que a administração intratumoral da nanoemulsão, uma vez que a inibição do crescimento tumoral foi observada após um período mais curto de tratamento quando a nanoemulsão foi administrada por iontoforese do que por via intratumoral. Os animais tratados por ambas as vias com a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe seguido da TFD não apresentaram metástases, diferentemente dos demais. A análise histológica dos tumores revelou a presença de células apoptóticas nos grupos tratados com a nanoemulsão contendo os fármacos, indicando que este foi um dos mecanismos responsáveis pelo efeito obtido. Desta forma, a iontoforese da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe seguido da TFD demonstrou ser uma estratégia promissora para o tratamento tópico do melanoma.

Palavras-chave: Nanoemulsão. Melanoma. Terapia Fotodinâmica. Terapia Anti-angiogênica. Iontoforese.

## ABSTRACT

DALMOLIN, Luciana Facco. **Iontophoresis-facilitated nano-dispersion delivery of immunotherapy associated with topical photodynamic therapy for treatment of melanoma**. 2019. 137 f. Thesis (Doctor of Science) – Faculty of Pharmaceutical Sciences in Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The association of photodynamic therapy (PDT) and immunotherapy as a strategy for the topical treatment of melanoma was investigated in this work. An O/A nanoemulsion was developed to facilitate the administration of a photosensitizer, zinc phthalocyanine (ZnF) for PDT and anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody, bevacizumab, for immunotherapy. The cytotoxicity and phototoxicity of drug-loaded nanoemulsion on melanoma cells and inhibition of endothelial cell proliferation was evaluated *in vitro*. The influence of iontophoresis on the cutaneous permeation of loaded drugs in the nanoemulsion and distribution in tumor cells was investigated *in vitro* in pig skin and *in vivo* in mouse-induced melanoma. In the latter, the efficiency of PDT and immunotherapy on tumor growth and metastasis was investigated following intratumoral and iontophoretic topical administration of nanoemulsion. The O/A nanoemulsion developed was stable under the application of electric current, solubilized more than 40 µg/mL of ZnF and decreased the aggregation of ZnF in biological medium. In B16F10 melanoma cells, ZnF-loaded nanoemulsion showed a higher phototoxic potential than ZnF solution with an IC<sub>50</sub> of 192 ± 6 ng/mL after irradiation, while in combination with bevacizumab, a further reduction of IC<sub>50</sub> to 56 ± 7 ng/mL was observed. In addition, the nanoemulsion increased by 4 folds, the cellular uptake of ZnF when compared to ZnF solution. The anti-angiogenic potential of nanoemulsion incorporated bevacizumab, evaluated in CRL-2922 endothelial cells, was confirmed by its ability to inhibit cell migration more effectively than the drug in solution after 24 h of treatment. *In vitro*, nanoemulsion increased ZnF skin penetration when compared to an emulsion of identical composition. With the application of only 30 min iontophoresis, nanoemulsion increased by almost 16 folds the penetration of ZnF into the deeper layers of the skin when compared to iontophoresis of the emulsion. *In vivo*, 30 min iontophoresis application allowed ZnF to reach melanoma induced under the skin of C57BL6 mice. Intratumoral and iontophoretic treatment of the induced tumor with the ZnF and bevacizumab loaded nanoemulsion followed by PDT decreased tumor growth by approximately 8 folds in comparison to control. Topical application through iontophoresis was observed to be as or more effective than intratumoral administration of nanoemulsion, as the inhibition of tumor growth was observed within a shorter period of iontophoretic nanoemulsion delivery rather than intratumoral treatment. Animals treated with both ZnF and bevacizumab loaded nanoemulsion followed by PDT showed no metastasis, unlike other treatment groups. Histological analysis of tumors revealed the presence of apoptotic cells in the groups treated with drug-loaded nanoemulsion, indicating apoptosis as one of the mechanisms responsible for the effect observed. Thus, iontophoretic delivery of ZnF and bevacizumab loaded nanoemulsion followed by PDT was shown to be a promising strategy for the topical treatment of melanoma.

Keywords: Nanoemulsion. Melanoma. Photodynamic Therapy. Anti-angiogenic therapy. Iontophoresis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias moleculares que se encontram desreguladas no melanoma.....	6
Figura 2 - Estágios do melanoma: (a) estágio 0, (b) estágio I, (c) estágio II, (d) estágio III, (e) estágio IV.....	8
Figura 3 - Isoformas de VEGF e suas ligações com os receptores de tirosina quinase nas células endoteliais.....	15
Figura 4 - Esquema representativo do mecanismo de ação do bevacizumabe (Avastin).....	16
Figura 5 – Esquema ilustrativo da terapia fotodinâmica tópica.....	18
Figura 6 - Diagrama de Jablonski modificado representando o processo de fotossensibilização na terapia fotodinâmica ( $S_0$ – estado fundamental singlete; $S^*_1$ e $S^*_n$ – subníveis vibracionais do estado singlete excitado; T1 – estado excitado tripleto; ISC – cruzamento intersistema; IC – cruzamento interno; S – substrato; $S^*$ - substrato oxidado).....	19
Figura 7 – Representação da estrutura química (A) e espectro de absorção típico (B) das ftalocianinas. Em (A) a letra M representa um íon metálico.....	22
Figura 8 - Representação esquemática da estrutura da pele, ampliando-se o estrato córneo (A), e das vias de penetração de fármacos (B).....	24
Figura 9 – Representação da estrutura de uma nanoemulsão O/A e A/O.....	26
Figura 10 - Esquema representativo da aplicação da iontoforese na pele.....	29
Figura 11 – Esquema representativo do mecanismo de: (a) eletro-osmose e (b) eletromigração.....	31
Figura 12 - Sistema de LEDs utilizado para a irradiação nos estudos de fototoxicidade <i>in vitro</i> .....	45
Figura 13 – Representação do procedimento para formação do eletrodo negativo (cátodo).....	49
Figura 14 – Fotografias do preparo em série de eletrodos de Ag em solução de NaCl 0,9%.....	49
Figura 15 – Fotografia do experimento de penetração <i>in vitro</i> com aplicação da iontoforese.....	51
Figura 16 - Fotografia do tratamento tópico da nanoemulsão com aplicação de iontoforese anódica nos camundongos com melanoma implantado.....	54

Figura 17 – Esquema dos grupos de tratamento do melanoma para cada uma das vias de administração.....	55
Figura 18 – Esquema do regime de tratamento utilizado.....	57
Figura 19 – Fotografia do sistema de laser utilizado para a irradiação dos animais a 670 nm para a TFD.....	57
Figura 20 - Linearidade do método. a) Espectros de emissão de fluorescência obtidos através das diferentes concentrações de ZnF em DMSO (10-200ng/mL). b) Curva analítica de ZnF em DMSO (n=3).....	61
Figura 21 - Comparação dos espectros de emissão de fluorescência de uma solução padrão de FZn a 200 ng/mL em DMSO e de uma nanoemulsão branca diluída em DMSO.....	62
Figura 22 – Aspecto macroscópico da emulsão (frasco da esquerda) e da nanoemulsão (frasco da direita) contendo ZnF.....	67
Figura 23 – Gráficos da distribuição do tamanho da nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe em PBS obtidos por DLS (a) e NTA (b).....	69
Figura 24 – Microscopia eletrônica de transmissão da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe com contraste negativo de acetato de uranila 2% obtidas com aumento de a) 20000x; b) 50000x.....	70
Figura 25 - Estabilidade da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe durante 60 dias de armazenamento à 4°C quanto ao: a) Tamanho, b) PDI, c) Potencial zeta e d) pH.....	71
Figura 26 – Viabilidade celular de diferentes concentrações de nanoemulsão branca sobre células de melanoma murino (n=4) mantidas protegidas da luz (a) ou irradiadas com LED de 660 nm na dose de luz de 8 J/cm <sup>2</sup> (b).....	72
Figura 27 – Viabilidade de células de melanoma tratadas com diferentes concentrações de ZnF (n=4) quando irradiadas ou não com LED de 660 nm na dose de luz de 8 J/cm <sup>2</sup> .....	73
Figura 28 – Viabilidade de células de melanoma tratadas com diferentes concentrações de bevacizumabe (n=4).....	74
Figura 29 - Viabilidade das células de melanoma murino (B16F10) quando irradiadas ou não com LED de 660 nm na dose de luz de 8 J/cm <sup>2</sup> após tratamento com diferentes concentrações das nanoemulsões contendo: a) ZnF e b) ZnF e bevacizumabe; (n=4).....	75

Figura 30 - Fototoxicidade da ZnF a 250 ng/mL em solução (livre), incorporada na nanoemulsão contendo apenas ZnF e incorporada na nanoemulsão contendo a associação de ZnF com bevacizumabe (n = 4).....	77
Figura 31 - Espectros de fluorescência da ZnF livre e da ZnF incorporada na nanoemulsão diluídas em meio de cultura DEMEM para concentração final de 100 ng/mL de ZnF (n=3).....	78
Figura 32 – Dot plots do <i>uptake</i> celular de ZnF por citometria de fluxo em células B16F10 (n=3), a) controle, b) solução de ZnF, c) nanoemulsão de ZnF e d) nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe. Os quadrantes Q1 e Q2 representam as células marcadas com ZnF.....	79
Figura 33 - Porcentagem de células vivas que internalizaram a ZnF.....	80
Figura 34 - Micrografias obtidas por microscopia confocal da internalização de ZnF pelas células B16F10 após 4 h de tratamento com solução de ZnF (a) ou nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe (b).....	81
Figura 35 – Imagens da proliferação de células endoteliais CRL-2922 em função do tempo, tratadas com 1 µg/mL de bevacizumabe em solução ou incorporado na nanoemulsão em relação ao controle (células não tratadas), obtidas em microscópio óptico invertido em objetiva de 10x.....	82
Figura 36 – Resultados da avaliação do efeito inibitório do bevacizumabe em células endoteliais CRL-2922 em função da porcentagem de inibição da proliferação celular (n=4).....	83
Figura 37 – Penetração passiva <i>in vitro</i> : ZnF extraída do (a) estrato córneo e da (b) E+D após o tratamento passivo da pele com a nanoemulsão de ZnF (barras pretas) e a emulsão de ZnF (barras cinzas).....	85
Figura 38 – Iontoforese <i>in vitro</i> : ZnF extraída do (a) estrato córneo e da (b) E+D após o tratamento iontoforético da pele com a nanoemulsão de ZnF (barras pretas) e a emulsão de ZnF (barras cinzas).....	86
Figura 39 – Imagens de criosecções de 20 µm de espessura perpendiculares a superfície da pele e do tumor obtidas em microscópio confocal representativas do resultado de penetração <i>in vivo</i> após diferentes tempos de aplicação da iontoforese na nanoemulsão de ZnF (EC+E: estrato córneo e epiderme, D: derme, H: hipoderme). As imagens representam a sobreposição do campo claro e do campo escuro. A fluorescência da ZnF foi observada no canal vermelho em aumento de 20 vezes	

( $\lambda_{exc}$ = 638 nm $\lambda_{em}$ = 640-700 nm).....	88
Figura 40 – Massa corporal dos camundongos durante o estudo <i>in vivo</i> (n=5) em função do tempo: a) tratamento intratumoral b) tratamento tópico com iontoforese.....	89
Figura 41 - Porcentagem de aumento do melanoma induzido em camundongos C57BL6 em função do tempo após injeção intratumoral das formulações (tampão fosfato - CN, nanoemulsão branca – NB, nanoemulsão de ZnF – NF e nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe – NFB) seguida ou não da irradiação com laser a 670 nm com dose de 100 J/cm <sup>2</sup> (n=5).....	90
Figura 42 - Porcentagem de aumento do melanoma induzido em camundongos C57BL6 em função do tempo após tratamento tópico com aplicação da iontoforese (0,5 mA/cm <sup>2</sup> durante 30 min) das formulações (tampão fosfato sem iontoforese – CN1, tampão fosfato com iontoforese (CN2), iontoforese da nanoemulsão branca – NB, da nanoemulsão de ZnF – NF e da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe – NFB) seguida ou não da irradiação com laser a 670 nm com dose de 100 J/cm <sup>2</sup> (n=5).....	91
Figura 43 – Micrografias representativas de cortes histológicos dos tumores retirados dos camundongos após os diferentes tratamentos corados com hematoxilina e eosina e obtidas com aumento de 20x (a e b) e 40x (c e d). As setas vermelhas apontam células com núcleo picnótico; as setas pretas apontam células do sistema imune (macrófagos e linfócitos); as setas amarelas apontam áreas de melanina abundante (pigmentação marrom escuro).....	94
Figura 44 – Fotografias dos órgãos com suspeita de metástase retirados dos camundongos após tratamento por injeção intratumoral. a) estômago, b) baço, c) fígado.....	95
Figura 45 – Micrografias representativas de cortes histológicos dos órgãos retirados dos camundongos com metástase do melanoma corados com hematoxilina e eosina e obtidos com aumento de 40x. a,b) baço; c,d) fígado. As setas amarelas apontam a polpa branca do baço; as setas verdes apontam a polpa vermelha do baço; a seta preta aponta uma veia centro lobular do fígado e as setas brancas apontam células metastáticas melanocíticas.....	96
Figura 46 – Micrografias obtidas por microscopia confocal de cortes histológicos representativos do tumor após os tratamentos com marcação de células apoptóticas pelo ensaio do TUNEL nos aumentos de 63 (a) e 40 vezes (b).....	97



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volume de solução de ZnF a 5 µg/mL em acetato de etila adicionado à pele para estudo de recuperação.....	38
Tabela 2 - Composição das nanoemulsões preparadas sem a adição dos fármacos (nanoemulsão branca).....	38
Tabela 3 - Descrição resumida dos grupos e tratamentos.....	56
Tabela 4 - Resultados da exatidão para os padrões de ZnF em DMSO (n=5).....	62
Tabela 5 - Resultados dos testes de precisão intracorrída e intercorrída para amostras de ZnF em DMSO (n=5).....	63
Tabela 6 - Resultados do estudo de recuperação de ZnF da pele dermatomizada de orelha de porco utilizando DMSO (n=3).....	64
Tabela 7 - Diâmetro das gotículas e índice de polidispersão (PDI) determinados por DLS, e potencial zeta das diferentes nanoemulsões preparadas.....	65
Tabela 8 – Características físico químicas da emulsão e da nanoemulsão compostas por 15% de fase oleosa e água na fase aquosa (formulação F5 da Tabela 2).....	66
Tabela 9 – Características da emulsão e da nanoemulsão contendo aproximadamente 4,5 µg/mL de ZnF.....	67
Tabela 10 - Características físico químicas da nanoemulsão quando preparada com PBS na fase aquosa.....	68
Tabela 11 – Tamanho e PDI da nanoemulsão de ZnF e agregados da solução de ZnF na mesma concentração de fármaco após diluição para 100 ng/mL de ZnF em meio de cultura DEMEM (n=3).....	77
Tabela 12 – Estabilidade das formulações de ZnF frente a corrente elétrica constante de 0,5 mA por 1 h.....	84
Tabela 13 – Razão entre a quantidade de ZnF após a penetração iontoforética e a quantidade de ZnF após a penetração passiva.....	87
Tabela 14 - Porcentagem de aumento do tumor em relação ao controle após 10 dias do tratamento com injeção intratumoral ou iontoforese da nanomeulsão de ZnF (NF) irradiada com laser (670 nm, 100 J/cm <sup>2</sup> ) e das nanoemulsões adicionadas também de bevacizumabe (NFB), irradiadas ou não.....	14

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Água em óleo
AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de Variância
BRAF	Proto-oncogene B-raf, proteína quinase serina/treonina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CN	Controle negativo
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
CV	Coeficiente de variação
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOTAP	N- [1- (2,3-dioleoiloxi) propil] -N, N, N-trimetilamônio
DP	Desvio padrão
E+D	Epiderme e derme
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizante
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de propídeo
ISC	Cruzamento intersistema
LD	Limite de detecção
LED	Diodo emissor de luz
LQ	Limite de quantificação
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MEK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MMP-2	Metaloproteinase 2
MMP-9	Metaloproteinase 9
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolina bromida)

NB	Nanoemulsão branca
NF	Nanoemulsão de Zinco ftalocianina
NFB	Nanoemulsão de Zinco ftalocianina e bevacizumabe
NTA	Rastreamento de nanopartículas
O/A	Óleo em água
P1GF	Fator de crescimento placentar
PBS	Tampão fosfato de sódio
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PDI	Índice de polidispersão
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rTdT	Enzima deoxinucleotidil terminal transferase
S <sub>0</sub>	Estado fundamental singleto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T <sub>1</sub>	Estado excitado tripleto
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
TFD	Terapia Fotodinâmica
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular
ZnF	Zinco Ftalocianina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 MELANOMA CUTÂNEO.....	4
2.2 TERAPIAS DISPONÍVEIS PARA O TRATAMENTO DO MELANOMA.....	10
2.3 TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA: BEVACIZUMABE.....	14
2.4 TERAPIA FOTODINÂMICA: ZINCO FTALOCIANINA.....	17
2.5 NANOEMULSÕES COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO TÓPICO PARA ADMINISTRAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZANTES.....	23
2.6 IONTOFORESE COMO MÉTODO FÍSICO PARA O AUMENTO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA.....	27
<b>3 OBJETIVO</b> .....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	35
4.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ZnF.....	35
<b>4.1.1 Validação do método analítico</b> .....	35
4.1.1.1 <i>Especificidade</i> .....	35
4.1.1.2 <i>Linearidade</i> .....	35
4.1.1.3 <i>Exatidão</i> .....	36
4.1.1.4 <i>Precisão</i> .....	36
4.1.1.5 <i>Limite de detecção e quantificação</i> .....	36
<b>4.1.2 Curva matrizada para quantificação de ZnF em pele de orelha de porco</b> .....	36
4.1.2.1 <i>Estudo de recuperação da ZnF na pele</i> .....	37
4.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES.....	38
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	39
<b>4.3.1 Tamanho e índice de polidispersão</b> .....	40
<b>4.3.2 Avaliação da concentração de gotículas da nanoemulsão</b> .....	41
<b>4.3.3 Potencial zeta e condutividade</b> .....	41
<b>4.3.4 pH</b> .....	41
<b>4.3.5 Análise morfológica</b> .....	41

<b>4.3.6 Determinação da ZnF incorporada.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.7 Estudo de estabilidade física.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> EM CULTURA DE CÉLULAS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.1 Padronização da concentração de gotículas da nanoemulsão em contato com as células.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4.2 Citotoxicidade das nanoemulsões frente as células de melanoma.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4.3 Fototoxicidade das nanoemulsões frente as células de melanoma.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4.4 Avaliação da fluorescência da ZnF e do tamanho das gotículas da nanoemulsão após contato com meio de cultura.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.5 Avaliação do <i>uptake</i> celular.....</b>	<b>46</b>
<i>4.4.5.1 Citometria de fluxo.....</i>	<i>46</i>
<i>4.4.5.2 Microscopia <i>cofocal</i> de varredura a laser.....</i>	<i>46</i>
<b>4.4.6 Avaliação do potencial antiangiogênico do bevacizumabe em células endoteliais.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA PASSIVA E IONTOFORÉTICA.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5.1 Eletrodos utilizados nos experimentos de iontoforese.....</b>	<b>48</b>
<b>4.5.2 Avaliação da estabilidade das formulações contendo ZnF frente a aplicação de corrente elétrica.....</b>	<b>50</b>
<b>4.5.3 Experimento <i>in vitro</i> de penetração passiva de ZnF a partir da nanoemulsão e da emulsão.....</b>	<b>50</b>
<b>4.5.4 Experimento <i>in vitro</i> de penetração iontoforética de ZnF a partir da nanoemulsão e da emulsão.....</b>	<b>51</b>
<b>4.5.5 Análise estatística.....</b>	<b>52</b>
<b>4.6 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>4.6.1 Animais.....</b>	<b>52</b>
<b>4.6.2 Implantação do tumor.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6.3 Definição do tempo de aplicação da iontoforese e avaliação da distribuição da ZnF no tumor.....</b>	<b>53</b>
<b>4.6.4 Avaliação do efeito da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe na TFD do melanoma.....</b>	<b>54</b>
<i>4.6.4.1 Avaliação do tamanho tumoral.....</i>	<i>58</i>
<i>4.6.4.2 Monitoramento da massa corpórea dos animais.....</i>	<i>58</i>

4.6.4.3 Coleta e preparo de amostras.....	58
4.6.4.4 Avaliação histológica do tumor e demais órgãos utilizando coloração com hematoxilina e eosina (HE).....	59
4.6.4.5 Avaliação da morte celular por apoptose no tumor pelo ensaio do TUNEL.....	59
4.6.4.6 Análise estatística.....	60
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
5.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ZnF NAS FORMULAÇÕES E NA PELE.....	61
<b>5.1.1 Curva matrizada para quantificação de ZnF na pele de orelha de porco.....</b>	<b>64</b>
<b>5.1.2 Estudo de recuperação de ZnF da pele.....</b>	<b>64</b>
5.2 OBTENÇÃO DA NANOEMULSÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	64
5.3 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E FOTOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> .....	71
<b>5.3.1 Padronização da concentração de gotículas da nanoemulsão em contato com as células.....</b>	<b>71</b>
<b>5.3.2 Citotoxicidade e fototoxicidade <i>in vitro</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>5.3.3 Avaliação da fluorescência da ZnF e do tamanho das gotículas da nanoemulsão após contato com meio de cultura.....</b>	<b>77</b>
<b>5.3.4 Avaliação do <i>uptake</i> celular.....</b>	<b>78</b>
<b>5.3.5 Avaliação do potencial antiangiogênico do bevacizumabe em células endoteliais.....</b>	<b>81</b>
5.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA PASSIVA E IONTOFORÉTICA.....	83
5.5 ESTUDOS <i>IN VIVO</i> .....	87
<b>5.5.1 Definição do tempo de aplicação da iontoforese e avaliação da distribuição da ZnF no tumor.....</b>	<b>87</b>
<b>5.5.2 Avaliação do efeito da administração intratumoral e da iontoforese da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe na TFD do melanoma induzido em camundongos.....</b>	<b>88</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>116</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é o tipo mais agressivo de câncer de pele. Apesar de sua incidência ser considerada baixa em relação aos outros tipos de câncer de pele, seus números triplicaram nas últimas três décadas provocando uma situação alarmante, visto que sua taxa de letalidade é bastante elevada em função da rápida progressão e disseminação da doença para outros órgãos (INCA, 2018).

Os tratamentos convencionais disponíveis incluem a intervenção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia, as quais podem ser combinadas. Existem muitos problemas associados a estes tipos de tratamento, como os graves efeitos adversos sistêmicos e a resistência aos fármacos (CHIN; MERLINO; DEPINHO, 1998; MONGE-FUENTES; MUEHLMANN; DE AZEVEDO, 2014). Neste contexto, na tentativa de contornar esses problemas, novas alternativas têm sido exploradas, dentre elas a imunoterapia e a terapia fotodinâmica (TFD).

A imunoterapia se baseia na administração de citocinas (interferons e interleucinas), anticorpos monoclonais ou outras substâncias que estimulam o sistema imunológico, modificando assim a resposta biológica. O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal que vem sendo avaliado e utilizado na imunoterapia de diversos tipos de câncer em associação com outros quimioterápicos (FUJITA et al., 2007; GERBER; FERRARA, 2005; LEE et al., 2008). Conhecido comercialmente como Avastin, o bevacizumabe foi o primeiro agente antiangiogênico aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso intravenoso no tratamento do câncer colorretal metastático em humanos (FERRARA et al., 2004). No tratamento do melanoma, pelo menos dois estudos de fase II mostraram um aumento na taxa de resposta objetiva e de sobrevida global dos pacientes quando o bevacizumabe foi administrado por via endovenosa em associação com carboplatina e paclitaxel (PEREZ et al., 2009) e com interferon- $\alpha$  (VARKER et al., 2007).

Apesar das evidências da efetividade da associação do bevacizumabe com outras terapias, um grande problema associado a sua administração sistêmica é a ocorrência de efeitos adversos como proteinúria, hipertensão, hemorragia, epistaxe, má cicatrização de feridas e o tromboembolismo venoso e arterial (FERRARA et al., 2004; GERBER; FERRARA, 2005; KIM et al., 2012).

A utilização da via tópica para administração do bevacizumabe vem a ser uma estratégia interessante para tratar tumores de pele, pois pode proporcionar uma

diminuição destes efeitos adversos e uma liberação direta do anticorpo no local pretendido. No entanto, a camada mais externa da pele, o estrato córneo, constitui uma eficiente barreira para a absorção de substâncias tóxicas do ambiente e também para a penetração de fármacos (JEPPS et al., 2013). A penetração cutânea passiva do bevacizumabe, que é uma macromolécula de caráter hidrofílico, até as camadas da pele onde as células tumorais estão localizadas é, portanto, dificultada pelo estrato córneo.

A iontoforese é um método físico que tem sido utilizado com o objetivo de aumentar a penetração de fármacos através do estrato córneo. Ela é uma técnica não-invasiva que utiliza uma corrente elétrica fraca, de até  $0,5 \text{ mA/cm}^2$  (KALIA et al., 2004). Especificamente, no tratamento do câncer de pele, a iontoforese tem sido utilizada para aumentar a penetração de quimioterápicos (HUBER et al., 2015; TAVEIRA et al., 2014) e de agentes fotossensibilizantes (FSs) utilizados na TFD (GELFUSO et al., 2008, 2011; LEMOS et al., 2016; LOPEZ et al., 2001).

A TFD tópica é uma modalidade terapêutica que vem sendo largamente utilizada para várias doenças cutâneas, inclusive no tratamento do melanoma (BEACK et al., 2015; MICHAÏLOV et al., 1997). Na TFD tópica, o FS deve penetrar na pele e se acumular preferencialmente nas células tumorais. A pele é então exposta à luz no comprimento de onda adequado de acordo com o espectro de absorção do FS. O FS absorve fótons e os fotoprodutos gerados por este processo (espécies reativas de oxigênio e oxigênio singleto) levam a morte das células tumorais por meio de uma série de reações fotoquímicas (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003). Os principais eventos biológicos provocados pela TFD que são de grande relevância na terapia antitumoral são: morte direta das células tumorais por necrose, apoptose ou autofagia, isquemia tumoral seguida de danos vasculares induzidos pela TFD e ativação do sistema imune contra os antígenos tumorais (AGOSTINIS et al., 2011).

Entretanto, a aplicação da TFD deve utilizar comprimentos de onda da luz em que o tecido biológico seja mais transparente a radiação luminosa, uma vez que componentes do próprio tecido, como a melanina, podem competir com o agente fotossensibilizante pela absorção da luz. Devido a isso, gerações modernas de FS, que absorvem luz em comprimentos de onda entre 600 e 850 nm (considerada a janela terapêutica da TFD), têm sido preferidas para o emprego no tratamento do melanoma (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). É o caso da zinco ftalocianina (ZnF), principal FS de segunda geração, que exhibe um elevado efeito fotodinâmico



(SHAO et al., 2013). Entretanto, a ZnF é uma molécula extremamente lipofílica, o que acaba dificultando seu uso clínico e a aplicação da iontoforese (GELFUSO et al., 2011).

Os benefícios da TFD com a administração tópica da ZnF podem ser aliados aos benefícios da ação do bevacizumabe no tratamento do melanoma, uma vez que a TFD deve atuar matando as células tumorais já instaladas no tecido e o bevacizumabe deve atuar impedindo o crescimento do tumor. Para isso, é necessária a utilização de um sistema de liberação capaz de possibilitar a administração dos dois fármacos associados, auxiliar na penetração na pele e ainda permitir a aplicação da iontoforese, necessária para direcionar os fármacos para as células tumorais e permitir que altas concentrações dos mesmos cheguem às camadas da pele onde estas células estão localizadas.

As nanoemulsões óleo-em-água (O/A) têm sido propostas como potenciais sistemas nanodispersos para a veiculação de moléculas lipofílicas e de macromoléculas como anticorpos (HAGIGIT et al., 2012; RAI et al., 2018). Devido as gotículas nanométricas da fase oleosa que as compõem (entre 50 e 500 nm), nanoemulsões são sistemas altamente estáveis e de natureza fluida. Quando aplicada topicamente, a nanoemulsão pode interagir com a barreira do estrato córneo, desorganizando-a e permitindo desta forma o aumento da penetração e partição dos fármacos que ela carrega para as camadas mais profundas da pele (MD et al., 2017; RAI et al., 2018). Ainda, nanoemulsões O/A podem permitir a passagem de corrente elétrica, possibilitando assim a aplicação da iontoforese, melhoram a estabilidade de fármacos e são capazes de veicular altas concentrações de substâncias lipofílicas, como a ZnF (SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004; YU et al., 2018).

Portanto, o presente trabalho visa o desenvolvimento de nanoemulsões contendo bevacizumabe e ZnF para administração por iontoforese visando o tratamento tópico de melanoma cutâneo por imunoterapia e TFD.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MELANOMA CUTÂNEO

A pele é o órgão de maior extensão do corpo humano. Existem diferentes tipos de câncer que podem acometer este órgão sendo divididos entre câncer de pele do tipo não melanoma, que são os mais comuns e incluem o carcinoma basocelular e o carcinoma escamoso celular, e o câncer de pele do tipo melanoma (TRACEY; VIJ, 2019). Mais de 90% dos casos de melanoma são cutâneos, ou seja, se localizam na pele, porém este tipo de tumor pode também se desenvolver inicialmente no olho ou em mucosas.

O melanoma cutâneo é o tipo mais agressivo dentre as neoplasias que acometem a pele. Apesar de representar apenas 3% de todos os casos de câncer de pele, ele é considerado o principal causador de mortes pela doença. Nos Estados Unidos o melanoma é o sexto câncer mais diagnosticado, alcançando proporções epidêmicas (TRACEY; VIJ, 2019). No Brasil está entre os mais frequentes em adultos jovens (20-39 anos), especialmente nas mulheres (“Estatística para Câncer de Pele Melanoma - Instituto Oncoguia”, 2018), assim como na Austrália onde representa a oitava causa mais comum de morte por câncer em pacientes desta mesma faixa etária (HARTMAN; LIN, 2019).

Para cada ano do biênio 2018-2019 o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que 2920 novos casos de melanoma sejam diagnosticados em homens e 3340 em mulheres, totalizando 6260 novos casos em toda a população brasileira. Os números do melanoma são especialmente preocupantes uma vez que revelam uma tendência de aumento das taxas nos últimos 30 anos (INCA, 2018).

Existe uma série de fatores de riscos que estão envolvidos com o surgimento da doença. A radiação ultravioleta por exposição ao sol ou bronzamento artificial, a presença de nevos melanocíticos ou displásicos, histórico familiar da doença ou características fenotípicas favoráveis como cabelos louros e olhos e pele clara são alguns deles. O melanoma é cerca de 20 vezes mais frequente em pessoas de raça branca do que negra (SCHADENDORF et al., 2018).

Para se diferenciar nevos benígnos de nevos sugestivos de melanoma existe uma regra internacional proposta pela Sociedade Americana de Câncer, chamada regra do “ABCDE”, que aponta os sinais e características indicativos de um nevo de pele do tipo melanoma. Estes sinais são a assimetria da lesão (letra A), presença de

bordas irregulares com contorno mal definido (letra B), diferentes tonalidades de cores em uma mesma lesão (letra C), diâmetro maior que 6 milímetros (letra D) e evolução da lesão com o passar do tempo (letra E) (ABBASI et al., 2004; ARRANGOIZ et al., 2016; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017).

O melanoma tem origem nos melanócitos, células localizadas na camada basal da epiderme responsáveis pela produção da melanina. A melanina é um pigmento sintetizado em organelas especializadas denominadas melanossomas. Logo após a síntese, a melanina é distribuída para os queratinócitos circundantes, acumulando-se próximo a região do núcleo, sendo responsável pela cor da pele (MEYLE; GULDBERG, 2009).

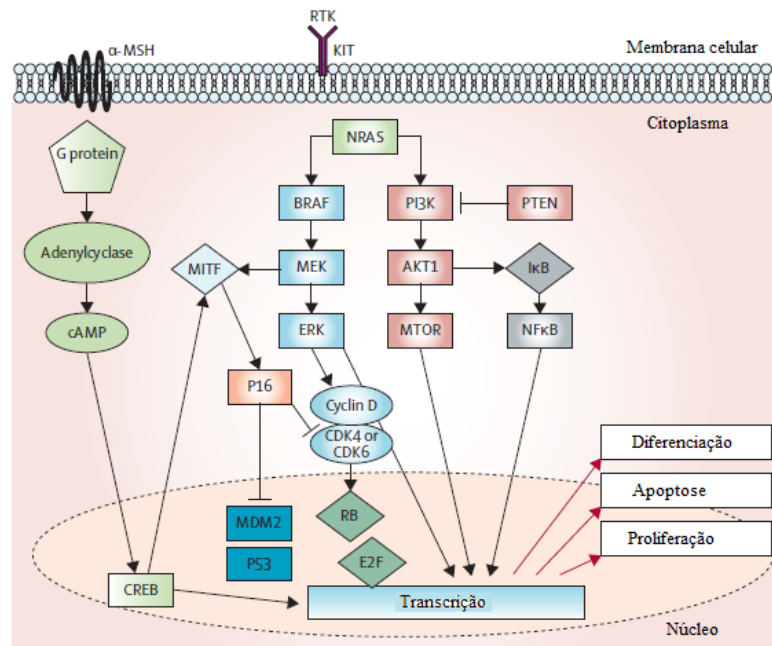
A interação complexa entre fatores desencadeantes exógenos e endógenos, bem como fatores imunológicos e fatores intrínsecos ao tumor, leva a transformação dos melanócitos normais em células neoplásicas do melanoma, oriundas de mutações e aberrações genéticas provocadas no DNA celular (SCHADENDORF et al., 2018).

A disseminação do melanoma é resultado tanto das mutações genéticas como de alterações do microambiente tumoral como a superexpressão de metaloproteinases (MMP-9 e MMP-2) que induzem a degradação de componentes da matriz extracelular e favorecem a invasão e infiltração do tumor através da corrente sanguínea (MORO; MAUCH; ZIGRINO, 2014).

As mutações mais frequentes do melanoma afetam genes que controlam diferentes mecanismos do processo celular, como a proliferação (BRAF, NRAS, NF1), crescimento e metabolismo (PTEN e KIT), resistência à apoptose (p53) e controle do ciclo celular (CDKN4A) (EGGERMONT et al., 2014; LEONARDI et al., 2018; SHAIN; BASTIAN, 2016).

Estes genes codificam proteínas que participam em diferentes vias moleculares específicas que se encontram desreguladas no melanoma: a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) como resultado das mutações nos genes NRAS, BRAF e KIT, a via da Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/AKT) como consequência de mutações no gene NRAS e PTEN e da expressão desregulada de AKT e a via da p16INK4A (inibidor das quinases dependentes de ciclina) devido a mutações principalmente em CDKN4A, BRAF e p53 (Figura 1) (TRACEY; VIJ, 2019; WANGARI-TALBOT; CHEN, 2013).

Figura 1 – Vias moleculares que se encontram desreguladas no melanoma.



Fonte: Adaptado de (EGGERMONT et al., 2014).

Do ponto de vista clínico e histológico, o desenvolvimento do melanoma é um processo de múltiplas etapas com diferentes características. A classificação geral dos estágios do melanoma é estabelecida de acordo com a espessura do tumor, o envolvimento dos linfonodos e a presença de metástase (SCHADENDORF et al., 2018).

Sendo assim, com base na classificação do *American Joint Committee on Cancer*, atualizada em 2017 (KEUNG; GERSHENWALD, 2018), no estágio 0, também chamado de melanoma *in situ*, já existem melanócitos anormais (células do melanoma) na epiderme, porém o tumor ainda não está formado (Figura 2a). No estágio I, a proliferação destes melanócitos leva a formação do tumor primário que se encontra em fase de crescimento radial, ou seja, desenvolve-se dentro da epiderme sem invadir a derme. O estágio I pode ser subdividido em estágio IA, em que a lesão tumoral é menor do que 1 mm de espessura e não apresenta ulceração, e estágio IB, em que a espessura é também menor do que 1 mm, porém com ulceração da lesão ou então o tamanho do tumor varia de 1 a 2 mm, sem ulceração (Figura 2b).

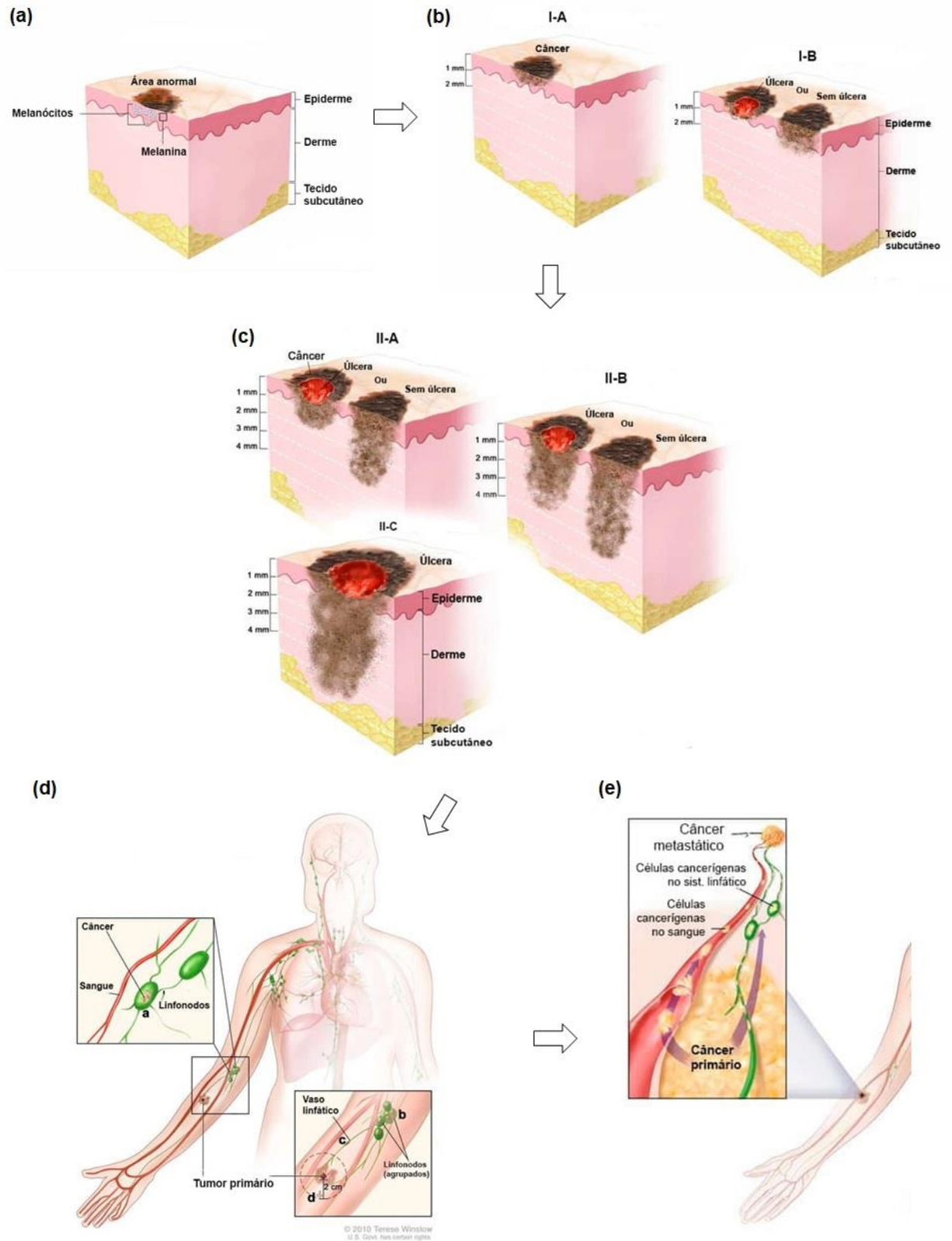
A medida que o tumor evolui, as células do melanoma adquirem maior potencial invasivo e com isso o tumor passa da fase de crescimento radial para a fase de crescimento vertical com invasão da derme, sendo considerado de estadiamento 2.

O estágio II se divide em 3 fases. Quando o tumor tem espessura entre 1 e 2 mm com ulceração ou espessura entre 2 e 4 mm sem apresentar ulceração o estágio é chamado de IIA. Se a espessura for entre 2 e 4 mm mas com ulceração ou maior que 4 mm sem ulceração, o estágio já é considerado um pouco mais avançado – estágio IIB. Na terceira fase do estágio II (estágio IIC) a lesão é maior que 4 mm de espessura e apresenta ulceração, porém os linfonodos próximos ainda não foram atingidos (Figura 2c).

O estágio III é aquele no qual, independente da espessura do tumor ou da presença ou não de ulceração, as células neoplásicas já se espalharam para um ou mais linfonodos ou estão em um vaso linfático entre o tumor primário e os linfonodos próximos. Além disso, novas pequenas lesões tumorais podem ser encontradas sobre a pele próximas ao tumor primário (Figura 2d).

Por fim, no quarto e último estágio, o câncer já apresenta metástase e células de melanoma são encontradas em um ou mais tecidos do corpo, como fígado, pulmão ou tecidos moles (Figura 2e).

Figura 2 - Estágios do melanoma: (a) estágio 0, (b) estágio I, (c) estágio II, (d) estágio III, (e) estágio IV.



Fonte: Adaptado de (NCI, 2018).

Existem 4 subtipos principais de melanoma que podem ser distinguidos de acordo com as diferenças clínicas e histológicas entre eles: melanoma disseminativo superficial, nodular, lentigo maligno e lentiginoso acral (OSSIO et al., 2017).

O tipo extensivo superficial é o responsável por cerca de 70% dos casos de melanoma e é também o mais comum em jovens. Aparece na pele como uma mancha plana ou levemente elevada de pigmentação variada e com bordas irregulares que geralmente se localiza nas costas ou membros inferiores. Apresenta uma fase de crescimento radial mais longa que favorece o diagnóstico no estágio inicial da doença. Este subtipo de melanoma é comumente associado a mutações do gene BRAF (CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; SHAIN; BASTIAN, 2016).

O melanoma nodular é o subtipo mais invasivo que pode aparecer de forma repentina como um nevo elevado, bem delimitado com coloração castanho claro, marrom-avermelhada ou preta que cresce rapidamente e pode eventualmente ulcerar e sangrar. É o segundo subtipo mais frequentemente encontrado, em torno de 15 a 30% dos casos de melanoma (ARRANGOIZ et al., 2016; CRAYTHORNE; AL-NIAMI, 2017; OSSIO et al., 2017; SHAIN; BASTIAN, 2016).

O lentigo maligno ocorre geralmente no rosto e em pessoas com faixa etária maior do que 60 anos, pois está associado ao dano provocado pela exposição da pele ao sol. Representa 4 a 10% dos casos. Desenvolve-se como uma mancha geralmente plana de crescimento assimétrico, bordas irregulares e coloração castanha à marrom escuro (ARRANGOIZ et al., 2016; OLSZOWSKI et al., 2017).

O melanoma lentiginoso acral é mais especificamente encontrado em pessoas da raça negra e se localiza nas unhas das mãos ou dos pés, palmas das mãos ou sola dos pés. Corresponde de 2 a 3% dos casos de melanoma e inicia como uma mancha preta ou marrom (OSSIO et al., 2017).

Classificação, estadiamento e subtipo de melanoma em conjunto devem ser considerados para o prognóstico e tratamento da doença.

As propriedades moleculares diferenciadas das células cancerígenas do melanoma garantem a elas não só evasão da apoptose e potencial de crescimento ilimitado, como também favorecem a angiogênese tumoral necessária para a ocorrência de metástases (LIU; SAEED SHEIKH, 2014).

A angiogênese é um processo de grande importância para proliferação, nutrição e sobrevivência das células tumorais (JOUR; IVAN; AUNG, 2016). O desenvolvimento de novos vasos no processo tumoral pode ocorrer tanto pelo

recrutamento de células progenitoras endoteliais diretamente da medula óssea ou através da ativação por células perivasculares de vasos já existentes, quanto pela habilidade das próprias células do tumor de adquirirem um fenótipo endotelial e participarem da formação de novos vasos (mimetismo vascular) (JAYSON et al., 2016; KERBEL, 2008). É por meio destes vasos sanguíneos que as células do melanoma atingem a circulação e migram para outros órgãos do corpo resultando no aparecimento de metástases.

Entender o mecanismo molecular e fisiológico envolvido na evolução do melanoma, bem como as características histológicas de cada subtipo ou estágio da doença permite maiores chances de sucesso na escolha do tratamento e também na busca de novas opções terapêuticas eficazes.

## 2.2 TERAPIAS DISPONÍVEIS PARA O TRATAMENTO DO MELANOMA

Assim como toda doença, fatores como o estágio do câncer, o local da lesão, o subtipo de melanoma e o quadro clínico geral da saúde do paciente devem ser levados em consideração para se definir o tratamento do melanoma.

Nos estágios bem iniciais da doença a abordagem de ressecção cirúrgica com a retirada de ampla margem de segurança é a primeira opção, sendo que a cirurgia pode envolver ainda a retirada dos linfonodos próximos. Muitas vezes a remoção cirúrgica pode também ser combinada com outras terapias (TRACEY; VIJ, 2019).

Dentre os tratamentos terapêuticos disponíveis, a radioterapia e a quimioterapia são os mais convencionais. A quimioterapia envolve o uso de substâncias químicas que afetam o funcionamento celular. O primeiro quimioterápico aprovado para o tratamento do melanoma foi a decarbazina em 1976, cujo mecanismo de ação envolve a alquilação do DNA celular (HARTMAN; LIN, 2019). A taxa de resposta global obtida em estudos com o tratamento por este fármaco, varia em torno 5 e 20% e foi observado que 2% dos pacientes tratados sobreviveram mais do que 5 anos (AHMANN et al., 1989; BAJETTA et al., 1994; JELIĆ et al., 2002; SERRONE et al., 2000; SILENI et al., 2001). Análogo da decarbazina, a temozolomida, pró-fármaco convertido no mesmo metabólito ativo da decarbazina em pH fisiológico, apresenta a vantagem de ser capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (NEWLANDS et al., 1997). Esta propriedade o torna mais efetivo do que a decarbazina em casos de melanoma avançado onde existem células metastáticas de melanoma no cérebro



(MIDDLETON et al., 2000).

Em função da baixa resposta da monoterapia, combinações com outros quimioterápicos como tamoxifeno, cisplatina, vincristina são empregados na maioria dos casos para se obter respostas clínicas mais efetivas (FALKSON et al., 1998; JELIĆ et al., 2002; SILENI et al., 2001).

Uma grande desvantagem associada à quimioterapia é a resistência aos fármacos, cuja principal causa se dá pela própria resistência à apoptose das células tumorais ou pela ação dos melanossomas, que expulsam e degradam o fármaco, impedindo sua ação (CHIN; MERLINO; DEPINHO, 1998; MONGE-FUENTES; MUEHLMANN; DE AZEVEDO, 2014; SOENGAS; LOWE, 2003). Desta forma, embora a quimioterapia tenha sido a primeira terapia utilizada para o tratamento do melanoma avançado, atualmente ela vem sendo mais empregada como tratamento paliativo de melanomas refratários ou recidivados (DOMINGUES et al., 2018).

Quanto a radioterapia, o melanoma é considerado um tumor radioresistente (KORCUM et al., 2009). O tratamento com radiação de alta energia para induzir a morte das células tumorais ainda é utilizado, mas as indicações da radioterapia tem sido cada vez menores (ESPENEL et al., 2017). É indicada como adjuvante no tratamento do melanoma depois da excisão cirúrgica completa de um melanoma primário e após a linfadenectomia com o objetivo de reduzir o risco de recorrência do tumor ou como tratamento paliativo em casos de pacientes com sintomas induzidos por metástase (HENDERSON et al., 2015).

Com o avanço das pesquisas na compreensão dos mecanismos moleculares e imunológicos envolvidos na progressão do melanoma, novas e especializadas terapias surgiram a partir de 2010 e têm sido aprovadas para o uso no tratamento do melanoma pelo FDA, entre elas a imunoterapia e a terapia-alvo (DOMINGUES et al., 2018).

Antes mesmo desta nova era de avanços, uma tentativa de imunoterapia e vacinação foi realizada entre 1995 e 1998, quando o uso de interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) e interleucina-2 foram aprovados para o tratamento do melanoma com a finalidade de aumentar a resposta imune do paciente contra as células tumorais. Como adjuvante e utilizado em altas doses, o IFN- $\alpha$  demonstrou aumentar de 5 a 10% a sobrevida livre de reincidência e de 2 a 5% a sobrevida global em estudos clínicos (BAJETTA et al., 1994; IVES et al., 2017; MOCELLIN et al., 2010). A monoterapia com altas doses de interleucina-2 também demonstrou bons resultados na resposta objetiva global (5-

27%), porém a alta toxicidade é um fator bastante limitante para seu uso (ATKINS et al., 1999, 2000; PETRELLA et al., 2007).

A recente utilização da imunoterapia teve como alvo o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) e a proteína de morte celular programada 1 (PD-1). Esses são receptores imunomoduladores expressos em células T que são ativados pelas células tumorais. Esta ativação causa a morte ou a inativação funcional das células T impedindo que estas exerçam suas funções imunoregulatórias contra o agressor (CARREAU; PAVLICK, 2019). Anticorpos monoclonais contra CTLA-4 (ipilimumabe) e contra PD-1 (nivolumabe e pembrolizumabe) foram aprovados em 2011 e 2014, respectivamente, para o tratamento do melanoma. O ipilimumabe, em ensaio clínico de fase III, foi o primeiro imunoterapêutico a demonstrar melhora significativa da sobrevida global de pacientes com melanoma metastático (HODI et al., 2010). Um outro estudo de fase III em pacientes com melanoma metastático que foram tratados com ipilimumabe associado à quimioterapia com decarbazina também demonstrou um aumento da sobrevida de 9,1 meses para 11,2 meses quando o anticorpo foi utilizado (ROBERT et al., 2011).

O nivolumabe e pembrolizumabe, quando desenvolvidos, também demonstraram boas e significantes melhoras na sobrevida global dos pacientes com melanoma metastático. Dados de um estudo clínico de fase I/II revelaram uma resposta global de 31% e uma média de sobrevida global de aproximadamente 17 meses com o tratamento com nivolumabe (TOPALIAN et al., 2012, 2014). Em um estudo de fase III a sobrevida livre da doença e a resposta global foram aumentadas em 2,9 meses e 26% respectivamente, quando se utilizou o tratamento combinado de nivolumabe e decarbazina em pacientes com melanoma metastático em comparação com a monoterapia quimioterápica (ROBERT et al., 2015a).

O efeito do pembrolizumabe foi maior que o do ipilimumabe em pacientes com melanoma avançado em estudo clínico de fase III, com a sobrevida livre de doença prolongada, maior sobrevida global (33% quando tratados com pembrolizumabe e 12% quando tratados com ipilimumabe) e menor toxicidade (ROBERT et al., 2015b).

Tão significativo quanto a imunoterapia foi o avanço obtido com a terapia alvo, visto que aproximadamente 70% dos pacientes com melanoma cutâneo apresentam modificações em genes específicos. Este tipo de terapia utiliza pequenas moléculas que são inibidores específicos de proteínas mutantes das vias de sinalização relacionadas com a proliferação das células tumorais e progressão da doença. Dentre

estas moléculas estão inibidores seletivos de BRAF V600E, tais como vemurafenibe, dafrafenibe e encorafenibe, e de MEK, tais como trametinibe, cobimetinibe e binimetinibe (DOMINGUES et al., 2018).

Vários estudos reportam mais de 50% de regressão tumoral com o uso de vemurafenibe na maioria dos pacientes com melanoma que apresentam mutação em BRAF (CHAPMAN et al., 2011; FLAHERTY et al., 2010; RIBAS et al., 2011). A combinação de inibidor de MEK (trametinibe) com inibidor de BRAF (dabrafenibe) foi aprovada pelo FDA em 2014 pois demonstrou bons resultados de aumento da resposta objetiva e redução de 25% do risco de progressão da doença (EROGLU; RIBAS, 2016; FLAHERTY et al., 2012; LIU et al., 2017; LONG et al., 2014). Diversos estudos clínicos utilizando inibidores de BRAF e MEK combinados entre eles ou em combinação com a radioterapia, imunoterapia e outras terapias alvo estão sendo testados (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019), pois na terapia alvo também ocorre o problema da rápida resistência do tumor ao tratamento, devido a um mecanismo de compensação de outras vias (RIZOS et al., 2014).

No geral, por mais que grandes avanços em número e tipos de terapias tenham sido alcançados, ainda existem muitas limitações e obstáculos no tratamento do melanoma. Um deles são os severos efeitos adversos que ocorrem devido, principalmente, a falta de seletividade dos diferentes tipos de terapias, já que todas são utilizadas pela via oral ou parenteral e acabam atingindo também células e vias regulatórias normais do organismo. O outro grande obstáculo é a eficiência reduzida dos tratamentos associada aos mecanismos de resistência do tumor para as terapias alvo, imunológicas, quimio e radioterápicas e ao rápido poder metastático deste tumor (LIU et al., 2018).

Assim, a exploração de diferentes terapias combinadas e vias de administração alternativas na tentativa de contornar esses problemas é de extrema importância. Neste sentido, a terapia anti-angiogênica associada à TFD tópica merece atenção pois pode ser capaz de contornar os dois grandes desafios do tratamento do melanoma: os efeitos adversos sistêmicos e a rápida disseminação do tumor para outros órgãos. Esta associação inovadora já tem sido estudada no tratamento de doenças degenerativas oculares, com a aplicação de um anticorpo antiangiogênico e de um agente fotossensível seguida da TFD (KABEEL et al., 2008; SAVIANO et al., 2014). No entanto, ainda não foi avaliada em tumores cutâneos devido, principalmente, a dificuldade em se associar estas duas terapias em um único sistema de veiculação

capaz de permitir a penetração de quantidades suficientes dos princípios ativos a partir da aplicação tópica na pele. Estas duas terapias, em especial, serão detalhadas nas próximas seções.

### 2.3 TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA: BEVACIZUMABE

Uma promissora abordagem da imunoterapia no tratamento do melanoma é a terapia anti-angiogênica. Como já mencionado, a angiogênese é um processo crítico para o crescimento do melanoma e que está totalmente correlacionado com a ocorrência das metástases (NIKOLAOU et al., 2013).

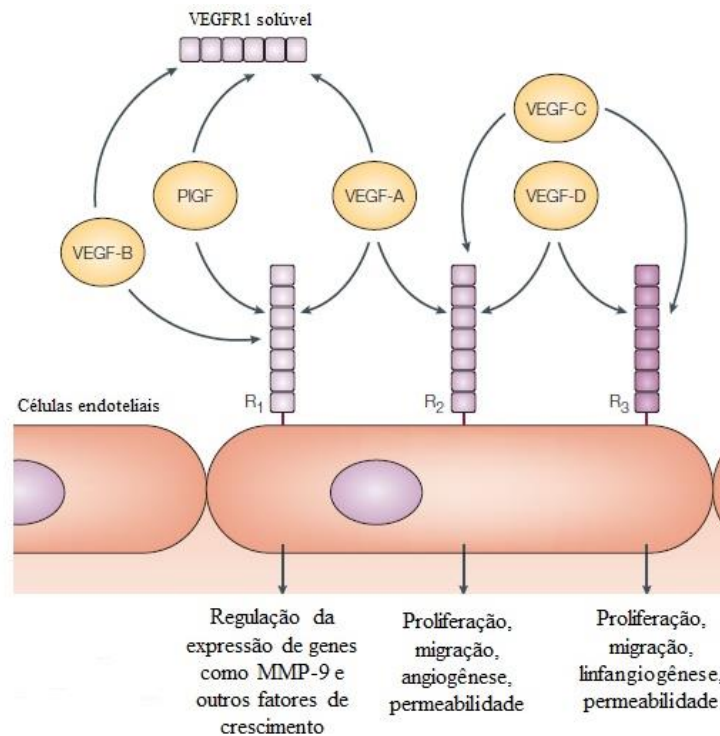
Visando uma alternativa terapêutica eficaz para o tratamento de tumores, o mecanismo de inibição da angiogênese tumoral foi proposto por Folkman em 1971. A partir daí muitos estudos começaram a ser realizados e novas moléculas antiangiogênicas passaram a ser testadas em pacientes (FOLKMAN, 1971).

A formação de novos vasos é controlada por uma variedade de fatores angiogênicos, dentre os quais o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é considerado o mais importante tanto na regulação da angiogênese fisiológica como na patológica (BERGERS; BENJAMIN, 2003). O aumento da demanda de oxigênio e nutrientes causado pela rápida proliferação das células tumorais leva a hipóxia local e faz com que as células do melanoma passem a secretar maiores quantidades de VEGF (ROFSTAD; DANIELSEN, 1998; SENGER et al., 1983), responsável por desencadear o mecanismo de neoangiogênese tumoral.

O VEGF pertence a superfamília de genes VEGF que é constituída pelas isoformas VEGF-A (na maioria das vezes referido somente como VEGF por ser o mais expresso), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentar – P1GF (FERRARA et al., 2004).

O VEGF tem sua ação mediada pela ligação com receptores da família das tirosina quinases nas células endoteliais, que incluem o VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 (JAYSON et al., 2016). O VEGF-A é o principal mediador no processo da angiogênese tumoral através da ativação do receptor VEGFR2 que constitui a via de sinalização responsável pelos efeitos angiogênicos, tais como alterações na permeabilidade vascular, proliferação endotelial, invasão, migração e sobrevivência. O receptor do tipo 1 (VEGFR1) tem alta afinidade pelo VEGF, porém sua ativação de quinases é fraca, já o receptor do tipo 3 (VEGFR3) está ligado principalmente a formação de novos vasos linfáticos (Figura 3) (FERRARA et al., 2004).

Figura 3 - Isoformas de VEGF e suas ligações com os receptores de tirosina quinase nas células endoteliais.



Fonte: Adaptado de (FERRARA et al., 2004).

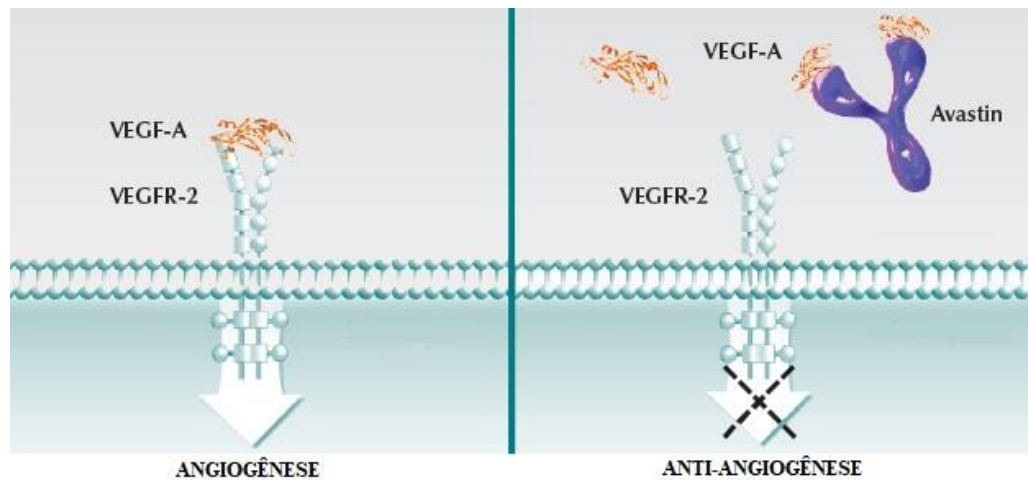
Os tumores malignos, como o melanoma, são altamente vascularizados e superexpressam o VEGF-A. Estudos já demonstraram que níveis muito maiores de VEGF são encontrados em lesões primárias de melanoma do que em nevos benignos da pele e que a superexpressão de VEGF em melanomas está relacionada com piores prognósticos e aumento de metástase tumoral (BIRCK et al., 1999; CLAFFEY et al., 1996; GORSKI; LEAL; GOYDOS, 2003; SALVEN; HEIKKILÄ; JOENSUU, 1997; UGUREL et al., 2001).

O bevacizumabe, comercialmente conhecido como Avastin<sup>®</sup>, foi o primeiro agente antiangiogênico aprovado pelo FDA para uso intravenoso no tratamento do câncer colorretal metastático em humanos em combinação com o quimioterápico fluorouracil (FERRARA et al., 2004). Atualmente ele é aprovado também para o câncer metastático de colón, câncer de pulmão de não pequenas células, câncer de mama, câncer de células renais metastático, câncer epitelial de ovário, tuba uterina e peritoneal primário e câncer de colo do útero (FERRUCCI et al., 2015). É um anticorpo monoclonal anti VEGF de massa molecular de 149kDa, constituído por 214 aminoácidos, desenvolvido por tecnologia de DNA recombinante em células de ovário

de hamster chinês, sendo considerado 93% humano e 7% murino (GOMES et al., 2012).

O bevacizumabe se liga com grande afinidade e neutraliza todas as isoformas de VEGF-A, impedindo que estas se liguem ao receptor do tipo 2 e ativem a cascata sinalizadora da angiogênese (Figura 4) (FERRARA et al., 2004; FERRARA; HILLAN; NOVOTNY, 2005).

Figura 4 - Esquema representativo do mecanismo de ação do bevacizumabe (Avastin).



Fonte: Adaptado de (GENENTECH, 2019).

A aprovação para o uso ocorreu em 2004 em função de respostas significativas que foram obtidas em estudos clínicos. Um estudo randomizado de fase III demonstrou que a associação de bevacizumabe com irinotecano, 5-fluorouracil e leucovorina levou a uma melhora significativa tanto na sobrevida global quanto na sobrevida livre de progressão e taxa de resposta geral em pacientes com câncer colorretal metastático (HURWITZ et al., 2004). Outro estudo de fase III em pacientes com câncer de mama metastático avaliou a associação de bevacizumabe com paclitaxel e obteve resultados positivos para o aumento da sobrevida livre de progressão (MILLER et al., 2007). No tratamento do câncer de pulmão, a adição de bevacizumabe ao regime terapêutico com paclitaxel e carboplatina também revelou benefício significativo de sobrevivência dos pacientes que apresentaram sobrevida livre de progressão prolongada e melhora na taxa de resposta (SANDLER et al., 2006).

Embora o bevacizumabe ainda não tenha sido aprovado para o uso no tratamento do melanoma, vários estudos já têm obtido respostas satisfatórias da sua

ação no tratamento deste tipo de tumor. Um estudo randomizado de fase II associando bevacizumabe com carboplatina e paclitaxel verificou aumento na taxa de resposta objetiva e na sobrevida global dos pacientes com melanoma em estágio IV (PEREZ et al., 2009). O mesmo benefício foi verificado por outro grupo, cuja mesma associação conduziu a um aumento na sobrevida livre de progressão bem como na sobrevida global, com taxa de resposta objetiva de 25% (KIM et al., 2012). Quando associado com temozolomida, resultados promissores também foram demonstrados com uma resposta global de 16% e curiosamente no grupo de pacientes com melanoma que apresentavam a mutação do gene BRAF o tempo de sobrevida global foi maior (VON MOOS et al., 2012). Atualmente, vários estudos clínicos estão sendo conduzidos, inclusive combinando inibidores de BRAF com o bevacizumabe no tratamento do melanoma (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019).

O bevacizumabe já foi testado também em combinação com outros imunoterápicos para o tratamento do melanoma (HODI et al., 2011). Em estudo de fase II, a co-administração de bevacizumabe com IFN- $\alpha$  levou a uma resposta clínica satisfatória em 24% dos pacientes com melanoma em estágio avançado e a estabilização da doença em outros 20% (VARKER et al., 2007).

Além do bevacizumabe, outros agentes antiangiogênicos já foram desenvolvidos e aprovados, porém ele é ainda o mais estudado.

#### 2.4 TERAPIA FOTODINÂMICA: ZINCO FTALOCIANINA

O potencial terapêutico da luz foi descoberto por Raab que observou que a combinação do corante laranja de acridina com a luz levava a morte de microorganismos (ALLEN; SHARMAN; VAN LIER, 2001). A partir disso, a fototerapia teve seu início em 1901 quando o pesquisador Niels Finsen utilizou da luz (UV e infravermelho) para o tratamento da varíola e da tuberculose cutânea (ROELANDTS, 2005). Sua pesquisa o levou ao prêmio Nobel em 1903, mesmo ano em que o termo “fotodinâmica” foi introduzido por Tappeiner e Jesionek que conduziram os primeiros testes da TFD para o tratamento de tumores da pele aplicando topicamente eosina e incidindo luz (TAPPENIER; H, 1903). Com o passar do tempo e com os resultados promissores obtidos por Thomas Dougherty em estudos clínicos em humanos utilizando a TFD (DOUGHERTY et al., 1975, 1978), ela passou a ser reconhecida como uma modalidade de tratamento para o câncer. Com isso, em 1993 o primeiro FS - Photofrin® - foi aprovado para o uso clínico no tratamento do câncer de bexiga

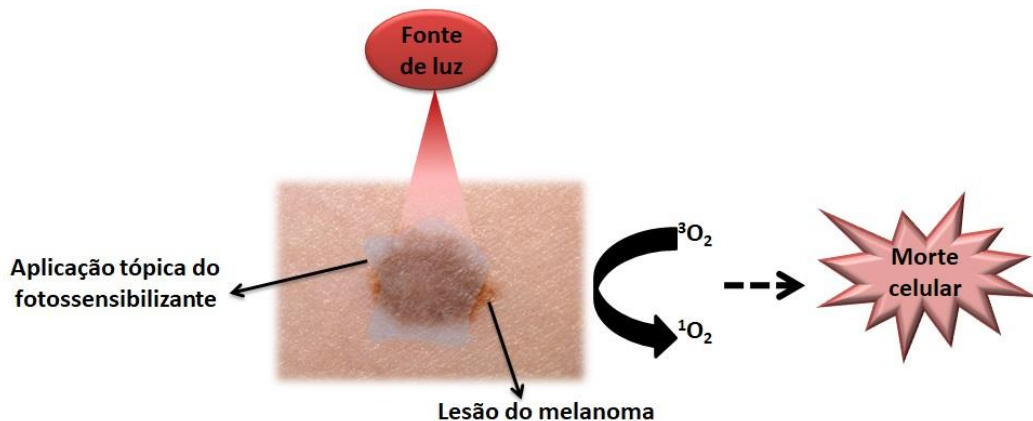
(DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

A TFD acontece como resultado de reações fotoquímicas e processos fotofísicos causados pela combinação de uma molécula fotossensibilizante (FS) com a luz, em um microambiente com a presença de oxigênio molecular. Esses 3 componentes (FS, luz e oxigênio) são fundamentais para que o efeito fotodinâmico ocorra de forma eficiente (AUSTIN et al., 2017).

O agente FS geralmente é administrado por via endovenosa ou tópica. A aplicação tópica garante maior seletividade visto que o FS é administrado no sítio do tratamento, com incidência direta da luz. Além disso, a TFD tópica é uma abordagem menos invasiva que vem sendo largamente utilizada para várias doenças cutâneas, inclusive no tratamento do melanoma (BALDEA et al., 2018; BALDEA; FILIP, 2012; BEACK et al., 2015).

Na TFD tópica, o FS deve penetrar na pele e se acumular preferencialmente nas células tumorais. A pele é então exposta à luz no comprimento de onda adequado de acordo com o espectro de absorção do FS (Figura 5).

Figura 5 – Esquema ilustrativo da terapia fotodinâmica tópica.

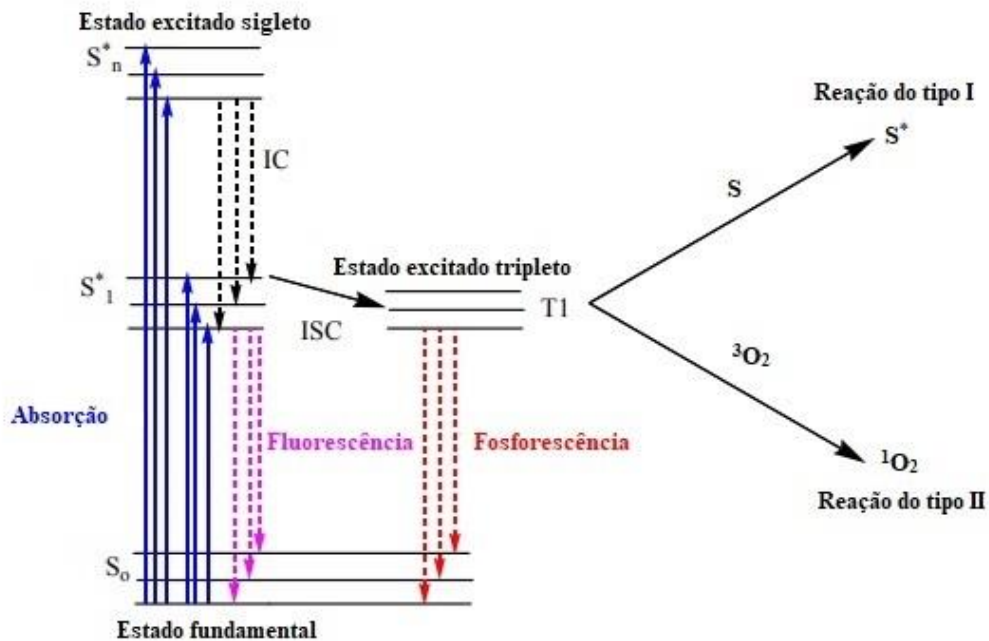


O processo de fotossensibilização pode ser entendido pela interpretação do Diagrama de Jablonski (Figura 6) (BALDEA; FILIP, 2012). Antes do FS absorver a luz ele se encontra em seu estado eletrônico fundamental singleto ( $S_0$ ). Quando irradiado pela luz em comprimento de onda específico, o FS é excitado e, pela absorção de fótons, passa para o estado singleto excitado. Este é constituído de vários subníveis vibracionais ( $S_1 - S_n$ ) e tem um tempo de vida curto (da ordem de nanosegundos). Por isso, o FS tende a perder rapidamente sua energia. Neste processo de perda ele pode voltar ao seu estado fundamental ( $S_0$ ), resultando na emissão de fótons e gerando



fluorescência, ou, através do cruzamento intersistema (ISC), passar para um estado metaestável de longa vida (microsegundos), chamado de estado excitado tripleto ( $T_1$ ). Neste estado, o FS pode seguir diferentes caminhos. O primeiro deles é voltar ao estado fundamental gerando fótons fosforescentes, processo denominado fosforescência. O outro é a interação com moléculas do ambiente biológico e, pela transferência de energia ou de elétrons, sofrer dois tipos distintos de reações: tipo I e tipo II (BALDEA; FILIP, 2012; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; MONGE-FUENTES; MUEHLMANN; DE AZEVEDO, 2014).

Figura 6 - Diagrama de Jablonski modificado representando o processo de fotossensibilização na terapia fotodinâmica ( $S_0$  – estado fundamental singlete;  $S^*_1$  e  $S^*_n$  – subníveis vibracionais do estado singlete excitado;  $T_1$  – estado excitado tripleto; ISC – cruzamento intersistema; IC – cruzamento interno; S – substrato;  $S^*$  - substrato oxidado).



Fonte: Adaptado de (DEBELE; PENG; TSAI, 2015).

Na reação do tipo I o FS excitado reage diretamente com substratos orgânicos presentes no microambiente tumoral (moléculas intracelulares ou componentes da membrana celular) oxidando-os ( $S^+$ ) e conseqüentemente sofrendo redução devido a transferência de elétrons ( $FS^-$ ). Os radicais formados neste processo reagem com o oxigênio e geram espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânions superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e radicais hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). Na reação do tipo II, que é o tipo predominante na TFD, o FS promove a transição do oxigênio presente no meio

biológico de seu estado basal tripleto ( $^3\text{O}_2$ ) para o estado excitado singleto ( $^1\text{O}_2$ ) através da transferência de energia. O oxigênio singleto é extremamente reativo e, portanto, interage rapidamente com diversas biomoléculas presentes no meio, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, oxidando-as (KIM; JUNG; PARK, 2015; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

A presença acumulativa destes fotoprodutos gerados durante todo esse processo de fotossensibilização (ROS e oxigênio singleto) levam aos efeitos tóxicos da TFD para as células tumorais (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

Os efeitos biológicos provocados pela TFD responsáveis pela destruição do câncer podem ocorrer de forma direta, por meio da morte das células tumorais por necrose, apoptose ou autofagia (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007; KESSEL; CASTELLI, 2001; REINERS JR et al., 2002), ou indireta, por meio de danos vasculares no microambiente tumoral que podem levar a isquemia do tecido, aumento da permeabilização dos vasos, estase do fluxo sanguíneo, formação de agregados plaquetários e/ou hemorragia (CASTELLANI; PACE; CONCIOLI, 1963; FINGAR, 1996; FINGAR et al., 1992; TSENG et al., 1988). Ainda, de forma indireta a TFD pode ativar o sistema imune contra os antígenos tumorais, levando ao aumento da produção de citocinas (interleucina 1- $\beta$ , interleucina 2, fator de necrose tumoral- $\alpha$ ) e metaloproteinases (AGOSTINIS et al., 2011; DAVIDS; KLEEMANN, 2010; DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; KROSL; KORBELIK; DOUGHERTY, 1995).

Os FSs empregados na TFD são moléculas sintéticas ou naturais que contêm em sua estrutura química anéis aromáticos e ligações conjugadas, o que lhes garante a capacidade de absorver a luz em comprimento de onda específico e desencadear as reações fotoquímicas e fotofísicas (ALLISON; SIBATA, 2010). Altos valores de coeficiente de absorção de luz, tempo de vida no estado tripleto e rendimento quântico de formação de oxigênio singleto de um FS estão diretamente relacionados com uma maior eficiência fotodinâmica (LI et al., 2019).

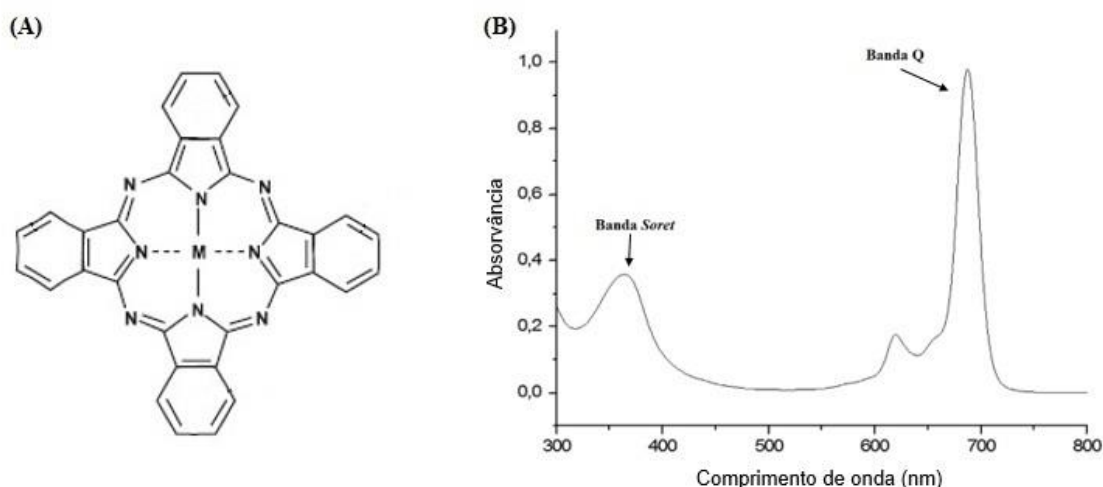
As moléculas FSs foram divididas em diferentes gerações com base na sequência de descoberta e características específicas de cada grupo. A primeira geração de FS desenvolvidos, em 1970, foi a classe das porfirinas, a qual é constituída pela hematoporfirina e seus derivados (KWIATKOWSKI et al., 2018). Estes compostos têm comprimento de absorção máxima da luz baixos (<600 nm) o que é uma desvantagem para a aplicação da TFD, especialmente para o tratamento do melanoma cutâneo, como explicado a seguir.

A presença de cromóforos endógenos na pele resulta na competição com o FS pela absorção da luz aplicada na TFD, diminuindo assim sua eficiência. A hemoglobina, por exemplo, é uma das principais responsáveis pela absorção da luz incidida na pele em 425, 544 e 577 nm, já os aminoácidos aromáticos absorvem em 260 nm e a água acima de 1200 nm (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). Mais significativo ainda do que a presença destas moléculas na pele, é a presença da melanina que se encontra em grande quantidade nas lesões cutâneas de melanoma. A melanina absorve luz em uma extensa faixa de comprimento de onda (300-800 nm), mas especialmente na faixa de 320 a 410 nm onde é seu pico máximo de absorção. Isso faz com que a TFD com FSs de primeira geração apresente uma baixa resposta no tratamento do câncer de pele do tipo melanoma (SHARMA; BOWERS; DAVIDS, 2011; SHARMA; DAVIDS, 2012). Em função disso, a janela terapêutica para a aplicação da TFD foi definida como a faixa de comprimento de onda entre 600 e 800 nm, pois é nela que acontece maior penetração da luz nos tecidos devido às poucas moléculas endógenas que absorvem luz especificamente nesta faixa (STOLIK et al., 2000).

Assim, as desvantagens dos FSs de primeira geração levaram ao desenvolvimento dos FSs de segunda geração cujos estudos começaram em 1980 (KWIATKOWSKI et al., 2018). Nesta categoria é que se enquadram, além de porfirinas modificadas, clorinas e bacterioclorinas, as ftalocianinas (KWIATKOWSKI et al., 2018; VAN STRATEN et al., 2017).

As ftalocianinas são compostos macrocíclicos tetrapirrólicos, ou seja, possuem quatro anéis pirrólicos associados a um anel benzênico e cada um deles está ligado ao outro por átomos de nitrogênio (Figura 7A). Em seu espectro de absorção, as ftalocianinas apresentam, de maneira oposta as porfirinas de primeira geração, uma banda de baixa energia, em torno de 650-750 nm, que é denominada banda Q. A banda Q é muito mais intensa do que a banda de alta energia, a banda de *Soret*, que aparece em aproximadamente 350 nm (Figura 7B). Desta forma, a banda Q confere as ftalocianinas um alto coeficiente de absorvidade molar nos comprimentos de onda da janela terapêutica da TFD ( $\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), resultando em melhores propriedades fototerapêuticas para o melanoma (OCHSNER, 1996; ONISZCZUK et al., 2016).

Figura 7 – Representação da estrutura química (A) e espectro de absorção típico (B) das ftalocianinas. Em (A) a letra M representa um íon metálico.



Fonte: Adaptado de (ALLEN; SHARMAN; VAN LIER, 2001).

Os anéis macrocíclicos das ftalocianinas podem conter em seu interior metais de transição como alumínio, rutênio ou zinco. A presença desses metais em sua estrutura aumenta a meia-vida do FS no estado tripleto e seu rendimento quântico de formação de oxigênio singleto, gerando conseqüentemente uma maior fototoxicidade para as células tumorais (SEKKAT et al., 2011; VAN LEENGOED et al., 1994; WOOD; HOLROYD; BROWN, 1997).

A ZnF é uma das moléculas pertencentes a classe das ftalocianinas que apresenta baixa toxicidade na ausência da luz, boa estabilidade e alta atividade fototóxica contra células tumorais que tem sido demonstrada em estudos *in vitro* (BOLFARINI et al., 2012; DE LIMA et al., 2017; RODAL et al., 1998; VALDUGA et al., 1998) e *in vivo* (CUI et al., 2013; SCHIEWECK et al., 1994; ZHOU et al., 1996). Essa potente ação na TFD está correlacionada com seu alto rendimento quântico de formação de oxigênio singleto (0,67 em DMSO em comparação com 0,59 apresentado pelo derivado da hematoporfirina em dimetilformamina), maior envolvido no mecanismo de ação da TFD através da oxidação e degradação de componentes celulares (D'SOUZA; OGBODU; NYOKONG, 2015; LI et al., 2008; OGUNSIPE; MAREE; NYOKONG, 2003; YU et al., 2018).

Assim como a maioria das ftalocianinas, a estrutura química da ZnF lhe confere alta lipofilicidade, uma característica favorável para seu acúmulo em células tumorais, porém que inviabiliza sua administração direta em qualquer meio biológico. Em meio

aquoso a ZnF tende a formar agregados, reduzindo drasticamente sua eficiência fotossensibilizante. Isto porque a atividade fotodinâmica é diretamente proporcional a presença do FS na forma monomérica (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004).

Devido a essa alta lipofilicidade e tendência de agregação, as ftalocianinas podem ser modificadas pela inserção de substituintes para adquirirem diferentes propriedades físicas e químicas, dentre elas uma maior hidrofiliabilidade à molécula (ALLEN; SHARMAN; VAN LIER, 2001). Entretanto, muitas destas modificações, como por exemplo a sulfonação das ftalocianinas, pode afetar também a eficiência da penetração celular e o rendimento quântico de formação de oxigênio singleto (CHIN et al., 2014).

Neste sentido, FSs de segunda geração têm sido associados a sistemas de liberação nanoestruturados capazes de promover a adequada administração destas moléculas, possibilitando sua solubilização em meio biológico e diminuição da formação de agregados (CONTE et al., 2013; TEDESCO; PRIMO; BELTRAME, 2016). Essa associação de FSs, seja com nanocarreadores ou anticorpos, fez surgir a terceira geração dos FSs (ALLISON; SIBATA, 2010).

## 2.5 NANOEMULSÕES COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO TÓPICO PARA ADMINISTRAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZANTES

Com o avanço da nanotecnologia na área farmacêutica houve o surgimento de diferentes sistemas nanoestruturados para veiculação de fármacos. O tamanho reduzido à escala de nanômetros e, em função disso, a ampla área superficial, confere características particulares de liberação, solubilidade, penetração, estabilidade e interação com os tecidos biológicos dos fármacos administrados por estes nanocarreadores (CARTER; NARASIMHAN; WANG, 2019).

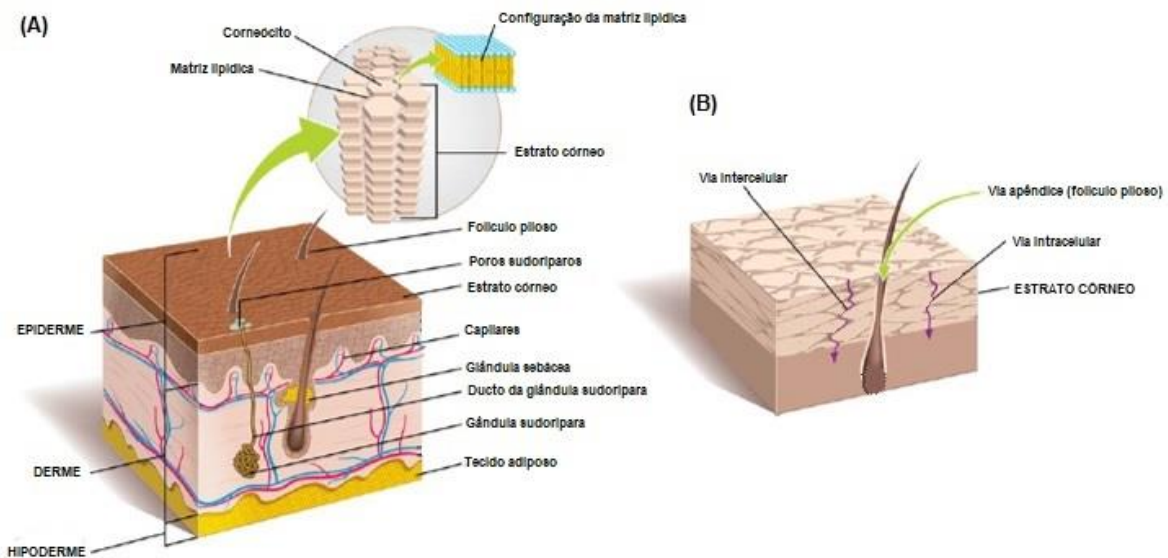
Diferentes sistemas nanoestruturados como lipossomas (ISELE et al., 1995; KIM; SANTOS; PARK, 2014; WANG et al., 1999), micelas poliméricas (SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004; YU et al., 2018), microemulsões (ARAÚJO; THOMAZINE; LOPEZ, 2010), nanoemulsões (RIBEIRO et al., 2015; ZHANG et al., 2011) e nanopartículas, tanto sólido-lipídicas como poliméricas (LIMA et al., 2013; OGAWARA et al., 2016; YOUSSEF et al., 2012), têm sido descritos na literatura para administração de FSs no tratamento por TFD de diversos tipos de câncer, inclusive do melanoma. A associação do FS com o nanocarreador têm demonstrado maior efeito fotodinâmico em comparação com os FSs em sua forma livre por conferir uma

melhor solubilidade do FS em meio biológico, evitando o processo de agregação (CASTAGNOS et al., 2014; CONTE et al., 2013).

O desenvolvimento de nanocarreadores é útil também para contornar outro grande problema da TFD tópica que é a baixa penetração destes fármacos para as camadas mais profundas da pele onde o melanoma se desenvolve. Essa baixa penetração se deve a presença do estrato córneo, camada mais externa da pele responsável por garantir a função barreira deste órgão.

A estrutura do estrato córneo é altamente organizada, composta por diversas camadas de corneócitos (células mortas e ricas em queratina) envoltos em uma matriz lipídica (PROW et al., 2011) (Figura 8a). Para penetrar a pele os fármacos utilizam principalmente a via intercelular, ou seja, difundem-se através da matriz lipídica (constituída por ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol). As outras vias menos comuns pelas quais a penetração pode ocorrer são a intracelular e via apêndices, como glândulas sebáceas e folículos pilosos (Figura 8b) (LEMOS et al., 2018).

Figura 8 - Representação esquemática da estrutura da pele, ampliando-se o estrato córneo (A), e das vias de penetração de fármacos (B).



Fonte: Adaptado de (LEMOS et al., 2018).

A composição e organização do estrato córneo dificultam tanto a penetração cutânea de fármacos hidrofílicos como de lipofílicos. Fármacos hidrofílicos não conseguem interagir com a matriz lipídica enquanto fármacos com alto coeficiente de

partição óleo/água (O/A) tendem a ficar acomodados na matriz lipídica e a não difundir para as camadas mais profundas da pele, como a epiderme e a derme (ROBERTS et al., 2017). A incorporação de fármacos em sistemas nanoestruturados compatíveis com a pele pode possibilitar a melhor interação e difusão dos fármacos para as camadas mais internas da pele onde se encontram as células tumorais, sem induzir efeitos adversos sistêmicos, uma vez que a aplicação é localizada no sítio alvo (MD et al., 2017).

Dentre todos os tipos, os sistemas nanoestruturados à base de lipídeos, como as nanoemulsões, apresentam grande potencial para a administração de FSs na pele, pois sua composição lipídica permite uma maior interação e consequente perturbação da organização lipídica do estrato córneo, aumentando a fluidez e facilitando a penetração dos FSs (BOUWSTRA et al., 2003; MD et al., 2017). Além disso, devido à similaridade em termos de lipofilicidade, estes sistemas lipídicos possuem uma grande capacidade de solubilização dos FSs lipofílicos em seu interior.

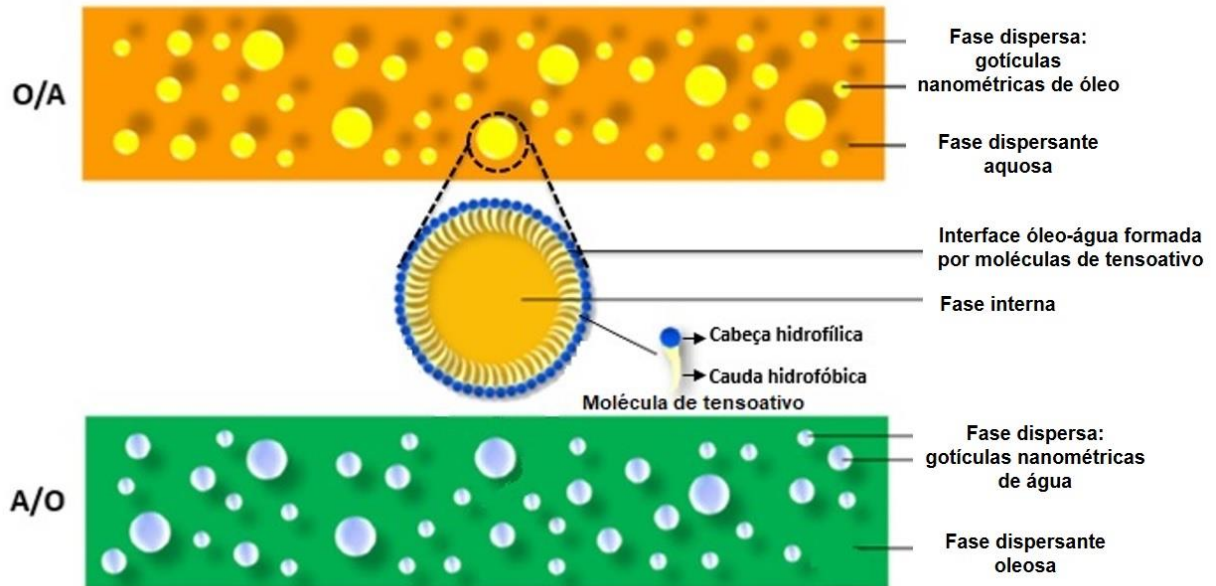
Nanoemulsões são sistemas constituídos de duas fases imiscíveis, em que uma encontra-se dispersa (fase dispersa) na outra (fase contínua) na forma de gotículas de tamanhos nanométricos que variam de 20 a 500 nm, estabilizadas pela presença de tensoativos e cotensoativos. De acordo com a natureza da fase dispersa, as nanoemulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A), quando a fase dispersante é a água, ou água em óleo (A/O) quando a fase dispersante é o óleo (Figura 9). Embora menos comuns, existem também as nanoemulsões múltiplas do tipo A/O/A ou O/A/O (SINGH et al., 2017; TAYEB; SAINSBURY, 2018).

As nanoemulsões apresentam estabilidade cinética, ou seja, permanecem estáveis por um longo período de tempo uma vez que a cinética de desestabilização destes sistemas é muito lenta em função do tamanho reduzido das gotículas, da presença dos emulsificantes na interface óleo-água e da energia aplicada para sua formação. Porém, do ponto de vista termodinâmico são consideradas instáveis, pois a energia livre da dispersão coloidal é maior do que a energia livre de cada uma das fases separadamente (MCCLEMENTS, 2012).

O processo de formação das nanoemulsões envolve principalmente técnicas que utilizam alta energia para cisalhar a fase dispersa em gotículas diminutas, uma vez que a concentração de tensoativos geralmente é baixa nestes sistemas nanoestruturados (ROBERTS et al., 2017). Dispositivos de ultrassom, homegeneizadores de alta pressão ou microfluidizadores são os equipamentos

utilizados na produção de nanoemulsões utilizando alta energia (RAI et al., 2018).

Figura 9 – Representação da estrutura de uma nanoemulsão O/A e A/O.



Fonte: Adaptado de (SINGH et al., 2017).

As nanoemulsões apresentam propriedades particulares que as tornam potenciais sistemas para a aplicação tópica de fármacos. Devido as suas características como a natureza fluida, a interface de tensoativos e a presença de duas fases com características distintas de solubilidade entre elas, as nanoemulsões são capazes de solubilizar e incorporar altas concentrações tanto de fármacos com características lipofílicas quanto hidrofílicas, de maneira concomitante ou não (GUPTA et al., 2016; TAYEB; SAINSBURY, 2018).

As nanoemulsões podem ainda alterar a permeabilidade da pele, desorganizando a barreira conferida pelo estrato córneo e permitindo, desta forma, o aumento da penetração e partição dos fármacos que carrega para as camadas mais profundas da pele. Ainda, o pequeno tamanho das gotículas da nanoemulsão proporciona uma grande área de superfície e distribuição uniforme dos princípios ativos na pele (MD et al., 2017; RAI et al., 2018).

A nível celular, as nanoemulsões apresentam boa capacidade de interação com as células pois podem solubilizar a barreira lipídica ou se fundir com a membrana celular (SINGH et al., 2017).

Vários estudos com nanoemulsões têm demonstrado as vantagens deste



sistema na aplicação tópica de fármacos para o tratamento do câncer de pele (PHAM et al., 2014; TAGNE; KAKUMANU; NICOLOSI, 2008), inclusive para a administração tópica de FSs utilizados na TFD. Nestes casos, os resultados de experimentos *in vitro* demonstram, de maneira geral, a melhor penetração dos FSs no estrato córneo e na epiderme e morte das células neoplásicas (ARAÚJO; THOMAZINE; LOPEZ, 2010; PRIMO et al., 2007, 2008; ZHANG et al., 2011).

As nanoemulsões podem também trazer vantagens para a veiculação de biomoléculas como o bevacizumabe. A degradação destas moléculas pelas enzimas metabólicas presentes na epiderme viável e na derme, por exemplo, pode ser reduzida quando administradas a partir de nanoemulsões, garantindo a estabilidade desta biomolécula quando administrada pela via tópica (BAROLI, 2010; HAGIGIT et al., 2012; HAUPTSTEIN; PRÜFERT; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2015; TAMAYO et al., 2017). Porém, para o caso da administração tópica de anticorpos, somente a veiculação por meio de sistemas nanoestruturados não é suficiente para garantir que estes fármacos consigam penetrar na pele, já que a alta massa molecular (>500 Da) é um dos fatores limitantes para a penetração tópica passiva de macromoléculas na pele (BAROLI, 2010; VOGT et al., 2016). Com isso, alguns trabalhos na literatura têm utilizado nanocarreadores em combinação com métodos físicos, como por exemplo a iontoforese, objetivando o aumento da penetração epidérmica, dérmica e transdérmica tanto de macromoléculas como de fármacos lipofílicos utilizados para o tratamento do câncer (GRATIERI; KALARIA; KALIA, 2011; HUBER et al., 2015; TAVEIRA et al., 2014; TOYODA et al., 2015).

## 2.6 IONTOFORESE COMO MÉTODO FÍSICO PARA O AUMENTO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Os métodos físicos têm sido aplicados em conjunto com sistemas nanoestruturados para uma maior eficiência no aumento da penetração cutânea de fármacos, uma vez que atuam por diferentes mecanismos que agem simultaneamente e com isso levam a um maior potencial como promotores da penetração. Essas associações são importantes e vantajosas especialmente no tratamento dos diferentes tipos de câncer de pele visto que, além do estrato córneo, a barreira tumoral também constitui um grande obstáculo para a penetração (CHAUHAN et al., 2011).

A iontoforese é uma técnica não invasiva que utiliza da aplicação de uma diferença de potencial e passagem de corrente elétrica constante de baixa intensidade

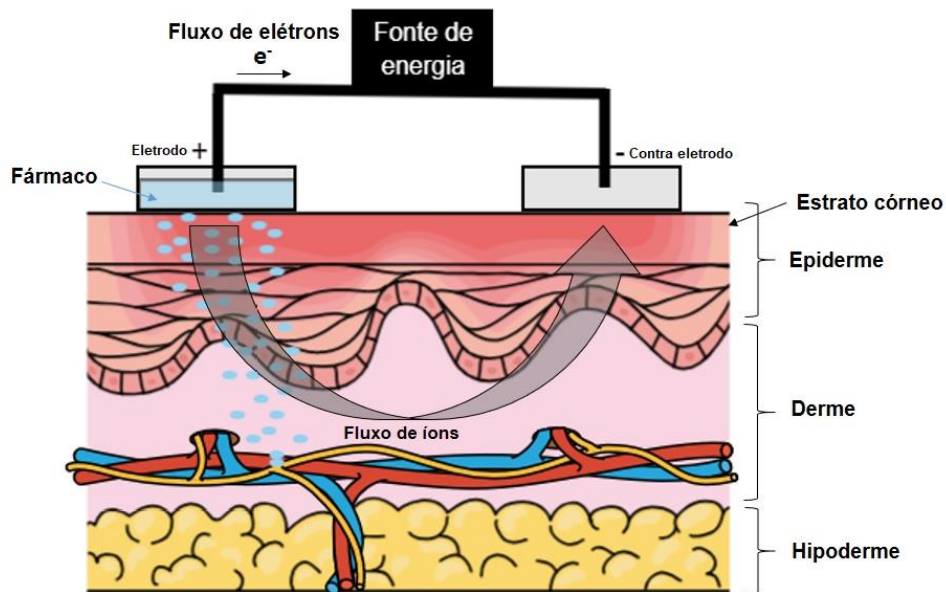
de forma contínua ou alternada através da pele para promover o aumento da penetração de fármacos. É um método físico eficiente tanto para o transporte de pequenas moléculas como macromoléculas. A densidade de corrente elétrica aplicada na pele geralmente varia de 0,1 a 0,5 mA/cm<sup>2</sup> (MERINO; CASTELLANO; DELGADO-CHARRO, 2017).

O interesse no estudo da iontoforese teve seu ápice em 1980 quando a via transdérmica ganhou destaque como via de administração de fármacos, porém sua eficiência no aumento da penetração de substâncias já havia sido verificada muito antes, em 1900, por Leduc. Para verificar a influência da iontoforese na penetração cutânea Leduc aplicou sobre a pele de coelhos uma solução de estricnina (um pesticida muito tóxico) e cianeto juntamente com a passagem de corrente elétrica. Pouco tempo após a aplicação da corrente elétrica os animais passaram a apresentar ataques tetânicos e outros sintomas de envenenamento por cianeto, fato que não aconteceu quando essas substâncias foram aplicadas sem a corrente elétrica (CHIEN; BANGA, 1989).

Desde então, a iontoforese vem sendo estudada para o tratamento do câncer (CHANG et al., 1993; FANG et al., 2004; HUBER et al., 2015; LEMOS et al., 2016; LOPEZ et al., 2003b; TAVEIRA et al., 2014; TSUJI, 1991), indução anestésica (CUBAYACHI et al., 2015; GLAVIANO et al., 2011), terapia gênica (ALJUFFALI; LIN; FANG, 2016; KIGASAWA et al., 2011; SOUIED et al., 2008; VENUGANTI, et al., 2015), imunização transcutânea (BERNARDI et al., 2016; TOYODA et al., 2015), bem como monitoração dos níveis sanguíneos de determinadas substâncias, como por exemplo a glicose (CHING; CONNOLLY, 2008; LIU et al., 2011; VENTURA et al., 2017).

A aplicação da iontoforese necessita de uma fonte de energia na qual a corrente elétrica é gerada, um compartimento no qual o eletrodo é colocado em contato com a formulação contendo o fármaco e outro compartimento, inserido próximo ao local de aplicação da formulação, no qual é inserido o contra-eletrodo (Figura 10). Para a penetração de fármacos com carga positiva ou neutra a iontoforese anódica costuma ser mais vantajosa, ou seja, o eletrodo positivo (ânodo) é colocado em contato com a formulação e o contra-eletrodo tem polaridade negativa (cátodo). Já a penetração de fármacos com carga negativa é favorecida pela aplicação da iontoforese catódica. Nesta, de maneira oposta a anódica, o eletrodo negativo (cátodo) é colocado em contato com a formulação (KALIA et al., 2004).

Figura 10 - Esquema representativo da aplicação da iontoforese na pele.



Existem diferentes tipos de eletrodos, porém, os mais utilizados na iontoforese são os eletrodos reversíveis de Ag/AgCl por serem quimicamente estáveis e suas reações eletroquímicas ocorrerem com tensão menor do que a necessária para a eletrólise da água, o que evita a variação de pH do meio (KALIA et al., 2004).

Para que as reações eletroquímicas aconteçam é necessária uma quantidade suficiente de íons cloro ( $\text{Cl}^-$ ) no compartimento anódico. Estes íons reagem com a prata formando cloreto de prata que, devido a sua baixa solubilidade, é depositada na superfície do eletrodo, liberando um elétron. Para manter a eletroneutralidade um cátion deve sair do compartimento anódico e entrar na pele ou então um ânion deve deixar a pele e passar para o compartimento anódico. Os elétrons liberados no compartimento anódico pela formação do cloreto de prata chegam ao compartimento catódico através da fonte de energia e promovem a redução do AgCl do eletrodo formando prata sólida (que permanece depositada no eletrodo) e liberando um íon  $\text{Cl}^-$  para a solução. Novamente, para a manutenção da eletroneutralidade, um cátion deve deixar a pele e passar para o compartimento catódico ou um ânion deve migrar do compartimento catódico para a pele. Desta forma, os íons inorgânicos endógenos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  da pele ajudam a manter a eletroneutralidade do sistema (KALIA et al., 2004).

De maneira geral, quando a corrente elétrica é aplicada ocorre o transporte de ânions do cátodo em direção ao ânodo bem como de cátions do ânodo em direção

ao cátodo (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

Para que a corrente elétrica seja transportada é necessário que o veículo/formulação na qual o fármaco esteja disperso tenha características hidrofílicas para possibilitar a presença de uma quantidade de íons suficientes. A intensidade da corrente elétrica, o tempo de aplicação e a área exposta são fatores que influenciam diretamente a quantidade de fármaco penetrada (GELFUSO et al., 2008).

Estudos verificaram que a corrente elétrica transporta os fármacos através da pele, principalmente, por meio dos folículos pilosos e ductos glandulares pois é a via que apresenta a menor resistência para o transporte (CULLANDER; GUY, 1991; SCOTT et al., 1993). Porém, a iontoforese também é capaz de provocar uma diminuição na resistência do estrato córneo em função da formação de regiões aquosas – polares – na matriz lipídica ou em função do enfraquecimento dos desmossomos, estruturas protéicas presentes na pele responsáveis pela junção celular dos corneócitos (FATOUROS et al., 2006).

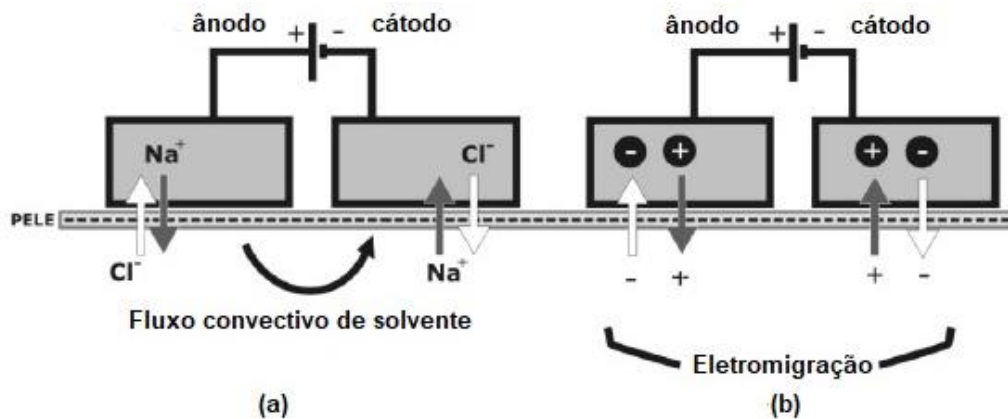
O mecanismo pelo qual a iontoforese promove a penetração de fármacos pode ser distinto em função da carga da molécula. Sendo assim, até o momento dois diferentes mecanismos foram elucidados como os principais envolvidos na penetração: a eletromigração e a eletro-osmose (BYRNE; YEH; DESIMONE, 2018; GUY et al., 2000).

O mecanismo de eletro-osmose ocorre pela movimentação de cargas que acontece na pele quando a corrente elétrica fraca é aplicada provocando um fluxo contínuo de solvente que carrega os fármacos. Esse movimento de cargas ocorre devido a seletividade da pele para penetração de cátions. Estudos na literatura demonstram que o número de transporte de íons  $\text{Na}^+$  através da pele é maior que o de íons  $\text{Cl}^-$  em pH 7,4 (BURNETTE; ONGPIPATTANAKUL, 1987; LAI; ROBERTS, 1999; LIDDELL; LI; HIGUCHI, 2011). Isso ocorre em função do baixo ponto isoelétrico da pele (em torno de 4,5) uma vez que quando uma formulação/solução acima deste valor de pH é aplicada, os grupos carboxilados dos aminoácidos encontram-se ionizados conferindo carga residual negativa à pele, favorecendo o transporte de cátions ( $\text{Na}^+$ ) e provocando um fluxo convectivo de solvente maior do ânodo em direção ao cátodo (Figura 11a) (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

No mecanismo por eletromigração, as moléculas do fármaco ionizadas submetidas a passagem de corrente elétrica migram em direção oposta ao eletrodo de mesma polaridade da carga das moléculas do fármaco, ou seja, cátions movem-

se em direção ao eletrodo negativo (cátodo) e ânions em direção ao ânodo (Figura 11b) (GUY et al., 2000; LEMOS et al., 2018).

Figura 11 – Esquema representativo do mecanismo de: (a) eletro-osmose e (b) eletromigração.



Fonte: Adaptado de (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

Desta forma, de maneira geral, o aumento da penetração de moléculas ionizadas com a aplicação da iontoforese ocorre principalmente pelo mecanismo de eletromigração, enquanto que o aumento da penetração de moléculas neutras é favorecido pelo mecanismo de eletro-osmose (WANG et al., 2005).

Vários estudos na literatura já demonstraram a eficiência da iontoforese no aumento da penetração de diferentes FSs utilizados na TFD, como ácido 5-aminolevulínico (LOPEZ et al., 2001, 2003a, 2003b), porfirinas hidrofílicas aniônicas e catiônicas (GELFUSO et al., 2008, 2011) e ZnF tetra sulfonada (LEMOS et al., 2016; SOUZA et al., 2011). Além disso, a capacidade da iontoforese em aumentar a penetração de macromoléculas como oligonucleotídeos capazes de induzir a resposta imune e a atividade antitumoral contra células de melanoma também já foi demonstrada (KIGASAWA et al., 2011).

No entanto, nenhum trabalho até o momento avaliou a influência da iontoforese na penetração da ZnF não substituída, justamente devido ao fato de sua alta lipofilicidade requerer uma forma farmacêutica predominantemente oleosa para solubilizar altas concentrações do FS, o que inviabiliza a passagem da corrente elétrica.

Sendo assim, uma das hipóteses deste trabalho é que a incorporação da ZnF em uma nanoemulsão O/A passível de passagem da corrente elétrica permitirá avaliar

a influência da iontoforese na TFD utilizando a ZnF como FS. Outra hipótese aliada as vantagens da nanoemulsão é a de que ela possibilite a veiculação e manutenção da estabilidade do anticorpo bevacizumabe, enquanto que a iontoforese aplicada possibilitará a penetração desta macromolécula em quantidades suficientes para a ação imunoterapêutica no tratamento do melanoma concomitantemente ao efeito fotodinâmico da ZnF.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe e avaliar *in vitro* e *in vivo* seu potencial no tratamento tópico do melanoma cutâneo por iontoforese.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Validar um método analítico por espectrofluorimetria para quantificação da ZnF na nanoemulsão e em pele;
- Desenvolver nanoemulsões catiônicas contendo ZnF e bevacizumabe e caracterizá-las quanto ao tamanho e concentração das gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, morfologia e concentração incorporada dos fármacos;
- Avaliar a citotoxicidade e a fototoxicidade *in vitro* da ZnF e do bevacizumabe, em solução e na nanoemulsão, em linhagem de melanoma murino B16F10;
- Determinar o IC50 da nanoemulsão de ZnF e da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe submetidas à irradiação;
- Avaliar a formação de agregados de ZnF em meio biológico em função do tamanho e da intensidade do pico de fluorescência da solução de ZnF e da nanoemulsão de ZnF diluídas em meio de cultura;
- Avaliar o *uptake* celular da ZnF por microscopia confocal e citometria de fluxo em linhagem de melanoma murino B16F10;
- Avaliar, *in vitro*, o potencial anti-angiogênico do bevacizumabe, em solução ou na nanoemulsão, em linhagem de células endoteliais CRL-2922 através da metodologia do *scracth*;
- Avaliar, *in vitro*, a penetração cutânea passiva e iontoforética da ZnF incorporada na nanoemulsão ou em uma emulsão de composição idêntica a da nanoemulsão;
- Avaliar, *in vivo*, por microscopia confocal, a influência da iontoforese da nanoemulsão na distribuição da ZnF na pele e no melanoma induzido em camundongos C57BL6;

- Avaliar a inibição do crescimento do melanoma induzido em camundongos C57BL6 após administração intratumoral e iontoforética de nanoemulsões contendo somente ZnF ou ZnF e bevacizumabe submetidos ou não à TFD;
- Avaliar a massa corporal dos animais ao longo do tratamento e a presença ou não de metástases através de análises histológicas;
- Avaliar a presença de células em processo de apoptose pelo ensaio do TUNEL em cortes histológicos dos tumores retirados dos animais.



## 4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ZnF

Um método analítico foi desenvolvido por espectrofluorimetria para quantificação da ZnF incorporada na nanoemulsão e extraída da pele após os estudos de penetração cutânea *in vitro*. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico com 4 faces polidas. Os parâmetros analíticos definidos foram: alta sensibilidade, resolução de 1 nm, velocidade de *scanning* rápida, largura da fenda óptica de 5/5 nm, comprimento de onda de excitação de 610 nm e monitoração da emissão de fluorescência no intervalo de 630-800 nm.

#### 4.1.1 Validação do método analítico

O método analítico foi validado quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e limite de detecção de acordo com as recomendações propostas na *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005).

##### 4.1.1.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada por comparação dos espectros de emissão de fluorescência de soluções padrão de ZnF em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, São Paulo, Brasil) e da nanoemulsão branca (sem ZnF) diluída em DMSO, com o objetivo de averiguar se haveria interferência de algum dos componentes utilizados na preparação das nanoemulsões no mesmo comprimento de emissão de fluorescência da ZnF.

##### 4.1.1.2 Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção de uma curva analítica obtida a partir da análise de sete concentrações diferentes de ZnF em DMSO (10, 40, 70, 100, 130, 160 e 200 ng/mL). As médias das áreas dos picos de cada concentração de ZnF foram plotadas no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações no eixo das abscissas. Estes valores foram utilizados para as análises estatísticas dos dados pelo método de regressão linear dos mínimos quadrados e expressas pela equação da reta de primeira ordem  $y = ax + b$ , onde  $a$  corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta, e  $b$  corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de

intersecção da reta com o eixo das ordenadas. As faixas lineares foram calculadas utilizando o coeficiente de correlação linear ( $r$ ).

#### 4.1.1.3 Exatidão

A exatidão do método foi verificada a partir da análise de 3 diferentes concentrações de ZnF dentro do intervalo da curva analítica: uma baixa a 10 ng/mL, uma média a 100 ng/mL e uma alta a 200 ng/mL, com 5 réplicas cada. A exatidão foi expressa por meio da porcentagem de recuperação e calculada utilizando-se a Equação 1.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração média determinada experimentalmente}}{\text{concentração teórica}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 1})$$

#### 4.1.1.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: I) repetibilidade ou precisão intra-corrída ( $n=5$  para cada concentração) e II) precisão intermediária ou precisão inter-corrídas ( $n=5$  para cada concentração). Para ambas, foram utilizadas soluções padrão de ZnF nas concentrações de 10, 100 e 200 ng/mL. A repetibilidade foi realizada em um mesmo dia e em um curto espaço de tempo entre as leituras, enquanto que a precisão intermediária foi avaliada em três dias diferentes. A repetibilidade e a precisão intermediária foram expressas pelo coeficiente de variação entre as amostras (CV), calculado segundo a Equação 2.

$$\text{CV (\%)} = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média determinada experimentalmente}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

#### 4.1.1.5 Limite de detecção e quantificação

Para avaliar a sensibilidade do método foram determinados os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD). Os LQ e LD foram calculados a partir dos valores da inclinação da curva ( $S$ ) e do desvio padrão do intercepto com o eixo  $y$  ( $\sigma$ ) obtidos de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{LD} = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{LQ} = 10 \frac{\sigma}{S} \quad (\text{Equação 4})$$

### 4.1.2 Curva matrizada para quantificação de ZnF em pele de orelha de porco

A quantificação de ZnF extraída das diferentes camadas da pele após o estudo de permeação cutânea *in vitro* foi calculada por meio de uma curva analítica matrizada construída a partir da extração de ZnF de pedaços de pele de orelha de porco dermatomizados a 700  $\mu\text{m}$ , com área de aproximadamente 1,4  $\text{cm}^2$  (área da célula de difusão), que foram previamente picotados e contaminadas com 5 mL de diferentes concentrações de soluções padrão de ZnF (10, 40, 70, 100, 130, 160 e 200 ng/mL)

em DMSO, cada concentração em quintuplicata.

Para a extração de ZnF, cada tubo contendo a pele picotada em contato com a solução padrão de ZnF foi agitado em vórtex durante 2 minutos (IKAWorks Inc., Delaware, EUA), submetido a agitação em homogeneizador de tecidos – ultraturrax T25 Digital (IKAWorks Inc., Carolina do Norte, EUA) por 1 minuto à 13500 rpm e por fim mantido em banho ultrassônico de 40 kHz (Quimis, São Paulo, Brazil) por 30 minutos. Após este procedimento de extração as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi filtrado em membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) 0,45  $\mu\text{m}$  para análise da área do pico de emissão de fluorescência por espectrofluorimetria utilizando os parâmetros do método analítico validado.

Os valores obtidos correspondentes à área do pico de emissão de fluorescência de cada concentração serviram para a construção da curva analítica matrizada, obtenção da equação da reta e determinação do coeficiente de correlação linear ( $r$ ).

#### *4.1.2.1 Estudo de recuperação da ZnF na pele*

A eficiência do método de extração da ZnF da pele foi verificada pelo estudo de recuperação em pele. Para isso, pedaços dermatomizados de pele de orelha de porco com área de  $\sim 1,4 \text{ cm}^2$  foram picotados e colocados em tubos de ensaio onde se adicionou volumes conhecidos de uma solução de ZnF a 5  $\mu\text{g/mL}$  em acetato de etila (Tabela 1). O acetato de etila foi evaporado, para deixar uma massa conhecida de fármaco em contato com a pele, e em seguida adicionou-se 5 mL de DMSO, utilizado como solvente extrator no estudo de penetração. O processo de extração utilizou vórtex por 2 min, homogeneizador de tecidos à 13500 rpm por 1 min, banho ultrassônico por 30 min e por fim as amostras foram centrifugadas por 10 min à 12000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e analisado por espectrofluorimetria utilizando-se a curva matrizada em pele de orelha de porco para determinar a concentração de ZnF.

Tabela 1 - Volume de solução de ZnF a 5 µg/mL em acetato de etila adicionado à pele para estudo de recuperação.

<b>Volume de solução de ZnF na concentração de 5 µg/mL adicionado à pele (µL)</b>	<b>Concentração final de ZnF (ng/mL) após a adição de 5 mL de DMSO</b>
40	40
100	100
200	200

#### 4.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES

Nanoemulsões foram preparadas utilizando-se ultrassom de baixa frequência a 20 kHz (Vibra-Cell VCX500, Sonics & Material INC., Connecticut, EUA). A fase oleosa foi constituída de triglicerídeos de cadeia média - TCM (6 a 12 átomos de carbonos) (Lipoid, Steinhausen, Suíça) e lipídeo catiônico DOTAP (N- [1- (2,3-dioleoiloxi) propil] -N, N, N-trimetilamônio) (Lipoid, Steinhausen, Suíça). A fase aquosa foi composta por solução aquosa de poloxamer 188 (Sigma, Missouri, EUA) 0,1% (p/v) em água. O tensoativo utilizado foi o polissorbato 80 (Synth, São Paulo, Brasil) e a fosfatidilcolina de ovo - Lipoid E80 - (Lipoid, Steinhausen, Suíça) foi utilizada como cotensoativo. Foram testadas diferentes proporções de TCM, tensoativo e cotensoativo de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Composição das nanoemulsões preparadas sem a adição dos fármacos (nanoemulsão branca).

<b>Componentes</b>	<b>Formulação (%)</b>				
	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>
TCM	7	8	10	10	15
Fosfatidilcolina de ovo	1	2	4	1	1
Polissorbato 80	5	2	4	3	5
DOTAP	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Poloxamer 188	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Água (q.s.p.)	100	100	100	100	100

Para o preparo das formulações, a fase oleosa juntamente com a fosfatidilcolina foi pesada e aquecida em banho maria (Nova Ética, São Paulo, Brasil) à 70°C até completa fusão. Separadamente, a fase aquosa foi aquecida em banho maria à 70°C

e vertida na fase oleosa. Essa mistura foi mantida sob agitação mecânica em vórtex (IKAWorks Inc., Delaware, EUA) por 5 minutos e então submetida ao ultrassom com amplitude de 50% e ciclo de trabalho de 1 s ON e 1 s OFF durante 5 minutos. A nanoemulsão obtida foi mantida em repouso por 24 horas e após este período foi centrifugada à 2500 rpm por 45 minutos (Thermo Scientific, Osterode, Alemanha) e filtrada em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 µm para completa remoção de impurezas e, quando presente, da ZnF não solubilizada.

Os fármacos foram incorporados a formulação F5 da seguinte maneira: 10 mg de ZnF (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (correspondente a 500 µg/mL na formulação final) foram adicionadas a fase oleosa previamente à adição da fase aquosa e o bevacizumabe (Avastin® 25 mg/mL, Roche, Basileia, Suíça) foi adicionado na concentração de 1 mg/mL na nanoemulsão já pronta, após a etapa de filtração, sob agitação em vórtex por 1 min.

Para comparação da eficiência de incorporação de ZnF em função do tamanho das gotículas da fase interna, a formulação F5 foi também utilizada para o preparo de uma emulsão. Para tanto, as fases aquosa e oleosa foram dispersas uma na outra como descrito anteriormente (fusão e emulsificação), porém a mistura não foi submetida ao ultrassom de baixa frequência. A emulsão obtida foi mantida em repouso até o resfriamento e posteriormente centrifugada à 2500 rpm por 45 minutos para separação da ZnF não solubilizada (precipitada).

Para garantir o transporte da corrente elétrica, a água da fase aquosa da formulação foi substituída por uma solução de tampão fosfato de sódio isotônico (PBS, 10 mM, pH 7,4), sendo que as demais etapas de preparação seguiram a metodologia específica para cada uma delas, conforme descrito anteriormente. Esta foi, portanto, a formulação final utilizada para a avaliação *in vitro* e *in vivo*, exceto para os experimentos de penetração cutânea, nos quais, para adequada comparação da influência do tamanho das gotículas na penetração cutânea da ZnF, nanoemulsão e emulsão foram preparadas com base nesta formulação, porém dissolvendo-se a ZnF no TCM na concentração de aproximadamente 30 µg/mL ao invés de adicionar 10 mg na fase oleosa. A emulsão preparada em PBS não apresentou estabilidade prolongada, porém manteve suas características iniciais durante o período de realização dos experimentos de penetração.

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

As formulações desenvolvidas foram caracterizadas em função do tamanho das gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta, condutividade, pH, morfologia, quantidade de ZnF incorporada e estabilidade física.

#### 4.3.1 Tamanho e índice de polidispersão

Para a nanoemulsão, o tamanho médio das gotículas e o índice de polidispersão (PDI) foram determinadas à 25°C pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) e pela técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) utilizando o NanoSight NS300 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

Para isso, as amostras foram diluídas em água ultrapura (100 e 50000 vezes para o DLS e NTA, respectivamente) e colocadas na câmara de análise, de modo que o feixe de luz (laser de HeNe 10mW operando em 633 nm) atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. O diâmetro hidrodinâmico -  $d(H)$  - das gotículas foi calculado pelo *software* dos equipamentos pela equação de Stokes–Einstein (Equação 5), em função das flutuações de intensidade da luz espalhada pela amostra, no caso do DLS, ou da dispersão da luz de cada gotícula da amostra individualmente, no caso do NTA.

$$d(H) = \frac{k_B.T}{3.\pi.\eta.D} \quad (\text{Equação 5}),$$

sendo  $k_B$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura em Kelvin,  $\eta$  a viscosidade do solvente e  $D$  o coeficiente de difusão translacional.

Para a determinação do tamanho pela técnica de NTA as análises foram realizadas em quintuplicata, já para a determinação por DLS as análises foram realizadas em triplicata.

Para a emulsão, a caracterização do tamanho médio das gotículas foi realizada pela técnica de difração à laser utilizando o equipamento LS 13320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer (Beckman Coulter, California, EUA). A amostra foi dispersa num fluído em movimento, que neste caso foi água ultrapura, sobre o qual o laser foi incidido e a radiação refletida, difratada ou transmitida foi detectada por detectores espalhados em posições estratégicas dentro da câmara de amostra. Os dados foram processados pelo *software* do equipamento utilizando as teorias de Mie ou Fraunhofer, gerando os valores de tamanho médio da amostra. A polidispersividade foi analisada com base no valor de SPAN que foi calculado de acordo com a Equação 6:

$$\text{SPAN} = \frac{(D_{90}-D_{10})}{D_{50}} \quad (\text{Equação 6}),$$

onde D10, D50 e D90 são os diâmetros médios de 10, 50 e 90% dos tamanhos cumulativos, respectivamente, fornecidos pelo equipamento. As análises foram realizadas em triplicata utilizando 3 diferentes formulações.

Em todos os casos, os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP).

#### **4.3.2 Avaliação da concentração de gotículas da nanoemulsão**

A análise da concentração de gotículas na nanoemulsão foi realizada por meio da técnica de restreamento de nanopartículas no equipamento NanoSight NS300. A nanoemulsão diluída 50000 vezes em água ultrapura foi bombeada por uma seringa para dentro de um compartimento onde um feixe de laser foi incidido sobre a amostra. O movimento Browniano das gotículas foi registrado por uma câmera acoplada ao equipamento rastreando os centros de dispersão da luz. Cada gotícula foi simultaneamente, mas individualmente, visualizada pelo *software* do equipamento que, além de calcular o diâmetro hidrodinâmico, fez a contagem do número de gotículas em função do volume de amostra analisado fornecendo, desta forma, um valor de concentração de gotículas por mL. Este valor foi multiplicado pela diluição utilizada para predizer a concentração total de gotículas na nanoemulsão (GROSS et al., 2016). As análises foram realizadas em quintuplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP.

#### **4.3.3 Potencial zeta e condutividade**

O potencial zeta e a condutividade das formulações foram determinados à 25°C através da mobilidade eletroforética utilizando o Zetasizer Nano ZS90. Previamente, as amostras foram diluídas em água (1:100) e colocadas na célula eletroforética onde um potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido. A análise foi realizada com laser de HeNe a 4mW, com comprimento de onda de 633 nm e ângulo de detecção de 90°. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  DP.

#### **4.3.4 pH**

A determinação do pH das formulações foi realizada utilizando-se um pHmetro digital (Digimed, São Paulo, Brazil) previamente calibrado. As amostras foram analisadas em triplicata, sem diluir, e os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP.

#### **4.3.5 Análise morfológica**

A análise morfológica das nanoemulsões foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão. Uma gota de cada amostra foi depositada em grades metálicas (200 mesh) de níquel com revestimento de polivinil butiral (Pioloform®) e adicionada de acetato de uranila a 2% como contraste negativo. Após 24 horas de secagem em temperatura de 25°C, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 100CX II, Massachusetts, EUA) com voltagem de 80 kV e aumento de 20, 50 e 100 mil vezes.

#### **4.3.6 Determinação da ZnF incorporada**

As formulações foram diluídas em DMSO e a ZnF nelas incorporada foi quantificada por espectrofluorimetria de acordo com o método descrito no item 4.1.

#### **4.3.7 Estudo de estabilidade física**

A nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe foi armazenada à temperatura de 4°C durante 60 dias. Em tempos pré-determinados de 1, 7, 30 e 60 dias, alíquotas da formulação foram submetidas à análise quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. Os valores médios de cada um destes parâmetros foram comparados com os valores médios obtidos no tempo inicial (1 dia). Para análise estatística dos resultados, obtidos em triplicata, foi utilizado o *software* Graphpad Prism 5.0 onde foi realizada a análise de variância (ANOVA) pareada seguida do pós teste de Tukey, sendo que valores de *p* menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados significativos.

### **4.4 ENSAIOS *IN VITRO* EM CULTURA DE CÉLULAS**

Para os estudos em cultura de células foram utilizadas duas diferentes linhagens celulares: uma tumoral, B16F10, originada de melanoma murino, e outra de células endoteliais, CRL-2922, que foram adquiridas do *American Type Culture Collection* (ATCC, Virgínea, EUA). As linhagens foram mantidas em criopreservação no nitrogênio líquido, em solução de congelamento com 10% de DMSO e 90% de soro fetal bovino inativado (Gibco, Nova York, EUA). Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas e expandidas em garrafas de cultivo celular, em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Nova York, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C em estufa incubadora (Thermo Fisher Scientific, Ohio, EUA) umidificada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para o cultivo em placa, as células foram removidas da garrafa através da adição de uma solução de tripsina (Tripsina 2,5%, Gibco, Nova York, EUA) a 0,5% em



solução salina (NaCl) 0,9% (Synth, São Paulo, Brasil), neutralizadas com meio de cultura e centrifugadas à 1500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer (Boeco, Hamburg, Alemanha) utilizando microscópio óptico invertido para visualização das células (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

#### **4.4.1 Padronização da concentração de gotículas da nanoemulsão em contato com as células**

Para evitar a morte celular causada por impedimento da troca de nutrientes entre células e o meio de cultura em função da alta concentração de gotículas oleosas da nanoemulsão, a concentração de gotículas da nanoemulsão branca que não alterasse a viabilidade celular foi determinada. Para isso, células B16F10 foram cultivadas em placas com 96 poços na densidade de  $2 \cdot 10^4$  células por poço e incubadas por 24 horas para aderirem na placa. Após este período, foram incubadas por 4 horas com 3 diferentes concentrações de gotículas da nanoemulsão branca diluída em meio de cultura:  $21 \cdot 10^{10}$ ,  $32,5 \cdot 10^{10}$  e  $65 \cdot 10^{10}$  gotículas/mL, correspondendo as diluições da nanoemulsão original de 1:120, 1:80 e 1:40, respectivamente, sempre protegidas da luz. O mesmo experimento foi realizado irradiando as placas com LED à 660 nm, na dose de  $8 \text{ J/cm}^2$  (item 4.4.3), após as 4 h de incubação. Depois disso as células foram lavadas com salina e incubadas por mais 24 h com meio DMEM não suplementado. A viabilidade celular foi então determinada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolina bromida) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (MOSMANN, 1983). Para isso, o MTT na concentração de 5 mg/mL foi diluído 20 vezes em meio de cultura sem vermelho de fenol e 200  $\mu\text{L}$  foram adicionados aos poços, seguido de 4 h de incubação. Após este período, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado de formazana resultante da redução do MTT no interior da mitocôndria das células viáveis foi dissolvido com 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. A absorvância característica das células viáveis foi determinada em 570 nm em um leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Com os valores obtidos calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (células tratadas somente com meio de cultura).

#### **4.4.2 Citotoxicidade das nanoemulsões frente as células de melanoma**

As células da linhagem B16F10 foram cultivadas em placas com 96 poços na densidade de  $2 \cdot 10^4$  células por poço e incubadas por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas com a nanoemulsão contendo somente ZnF e com a

nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe. As mesmas foram diluídas em meio de cultura de modo a obter poços com ZnF na faixa de concentração de 10 a 500 ng/mL e bevacizumabe na faixa de concentração de 0,3 a 14,8 µg/mL. Em todos os poços tratados com as nanoemulsões a concentração de gotículas utilizada foi mantida constante ( $3,25 \cdot 10^{11}$  gotículas/mL).

Além do controle composto por células tratadas apenas com meio de cultura, como controles da citotoxicidade dos fármacos livres (não incorporados na nanoemulsão) foram utilizadas soluções de ZnF e soluções de bevacizumabe. Para tanto, a ZnF foi dissolvida em DMSO e diluída no meio de cultura a fim de se obter poços com ZnF na faixa de concentração de 3,9 a 250 ng/mL. Em todas os poços, a concentração final de DMSO utilizada foi de 1,25%. Um controle somente com DMSO nessa concentração também foi avaliado. O bevacizumabe foi diluído diretamente no meio de cultura a fim de se obter poços com bevacizumabe na faixa de concentração de 0,8 a 25 µg/mL.

As células foram incubadas com as diferentes formulações, em quadruplicata para cada concentração, por 4 h e 30 min. Após este período, as células foram lavadas com salina e incubadas por mais 24 horas com meio DMEM não suplementado. A atividade citotóxica foi então determinada pelo ensaio de MTT como descrito anteriormente (item 4.4.1).

Como controle experimental, devido ao fato da ZnF ser uma tintura, para garantir que ela não interferiu na leitura da absorvância ou reagiu com o MTT formando composto semelhante a formazana, poços contendo diferentes concentrações de ZnF foram adicionados de MTT, incubados e avaliados da mesma forma que as placas que continham as células.

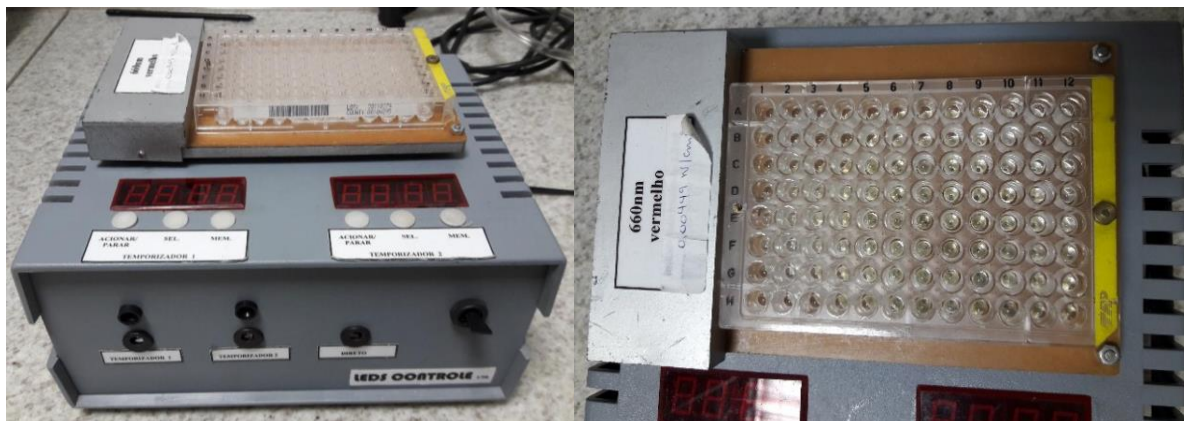
Para cada fármaco livre e nanoemulsão avaliados foram construídos gráficos da porcentagem de viabilidade celular em função da concentração de fármaco para calcular o IC50%, ou seja, a concentração de fármaco necessária para matar 50% das células. Todas as concentrações foram avaliadas em quadruplicata e os resultados analisadas estatisticamente usando ANOVA seguido do pós teste de Tukey.

#### **4.4.3 Fototoxicidade das nanoemulsões frente as células de melanoma**

As células B16F10 foram tratadas com as mesmas formulações e nas mesmas faixas de concentração que as utilizadas no estudo de citotoxicidade (item 4.4.2). Para os ensaios de fototoxicidade, no entanto, após 4 h de tratamento com as formulações as células foram irradiadas com diodo emissor de luz (LED) à 660 nm, na dose de 8

J/cm<sup>2</sup> (Figura 12).

Figura 12 - Sistema de LEDs utilizado para a irradiação nos estudos de fototoxicidade *in vitro*.



Para determinar o tempo necessário de irradiação para que a dose de 8 J/cm<sup>2</sup> fosse alcançada, a intensidade de irradiação, distribuída uniformemente nos poços da placa de cultivo celular de 96 poços, no comprimento de onda de 660 nm foi determinada utilizando-se um radiômetro USB4000 (Ocean Optics, EUA), alocado no Laboratório de Radiometria Ótica e Dosimetria do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, e correspondeu a 4,49 mW/cm<sup>2</sup>. O tempo de irradiação necessário para fornecer a dose de luz de 8 J/cm<sup>2</sup> foi calculado de acordo com a Equação 7:

$$D = I \cdot t \quad \text{(Equação 7),}$$

onde  $D$  é a dose de luz expressa em J/cm<sup>2</sup>,  $I$  é a irradiância expressa em W/cm<sup>2</sup> e  $t$  é o tempo expresso em segundos.

Assim, as células foram irradiadas por 30 min e depois do período de irradiação foram incubadas por mais 24 horas com meio DMEM não suplementado. A atividade fototóxica foi então determinada pelo ensaio de MTT como previamente descrito (item 4.4.1) e a viabilidade celular e IC<sub>50</sub> avaliados como descrito no item 4.4.2.

#### **4.4.4 Avaliação da fluorescência da ZnF e do tamanho das gotículas da nanoemulsão após contato com meio de cultura**

Para inferir sobre a eficiência fotodinâmica da ZnF incorporada na nanoemulsão, a intensidade de fluorescência da ZnF, incorporada ou não na nanoemulsão, foi avaliada após diluição em meio de cultura. Solução de ZnF em DMSO e nanoemulsão contendo ZnF, ambas a 100 ng/mL de ZnF, foram diluídas 80 vezes em meio de cultura DMEM, seguindo a mesma diluição utilizada para o

tratamento das células nos experimentos de cito e fototoxicidade. Após diluídas, as amostras foram submetidas a avaliação do tamanho por DLS (conforme item 4.3.1) e também analisadas em espectrofluorímetro utilizando os parâmetros do método analítico de quantificação da ZnF (item 4.1).

#### **4.4.5 Avaliação do *uptake* celular**

O *uptake* celular da ZnF pelas células B16F10 foi avaliado por duas diferentes técnicas: citometria de fluxo e microscopia confocal de varredura a laser.

##### *4.4.5.1 Citometria de fluxo*

A avaliação do *uptake* celular de ZnF por citometria de fluxo foi realizada em um citômetro BD FACSCanto II (BD Biosciences, California, EUA). Para isso, células de melanoma murino B16F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de  $4 \cdot 10^5$  células/poço e incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período as células foram lavadas com solução salina e tratadas por 4 h com solução de ZnF em DMSO 1,25%, nanoemulsão de ZnF ou nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe, todas na concentração de 250 ng/mL de ZnF. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com salina e tripsinizadas com 300 µL de tripsina 0,25%. Em seguida, a ação da tripsina foi neutralizada adicionando-se meio completo e as células foram coletadas em tubos cônicos e centrifugadas por 10 min a 1500 rpm. Para análise no citômetro de fluxo, o sobrenadante foi retirado, as células foram ressuspensas em meio de cultura e 1 µL de iodeto de propídeo (IP) foi adicionado na concentração de 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) como marcador de células mortas. A marcação do IP foi visualizada utilizando  $\lambda_{exc}$  488 e  $\lambda_{em}$  630±22 e a marcação de ZnF foi monitorada pelo  $\lambda_{exc}$  633 e  $\lambda_{em}$  660±20.

##### *4.4.5.2 Microscopia cofocal de varredura a laser*

Para a análise do *uptake* celular por microscopia confocal foram utilizadas placas de 24 poços nas quais foi colocada uma lamínula circular esterilizada de 20 mm de diâmetro (VidroBras, São Paulo, Brasil) em cada poço. As células foram plaqueadas sobre as lamínulas na densidade de  $8 \cdot 10^4$  células/poço e incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período as células foram tratadas por 4 h com solução de ZnF ou nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe, ambas na concentração de 375 ng/mL de ZnF. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e as células foram lavadas duas vezes com solução salina seguido da adição de 500 µL de solução de paraformaldeído 1% em cada poço para fixação das células. As placas foram vedadas e mantidas *overnight* a 4°C. Após fixadas, retirou-se o

paraformaldeído, as células foram novamente lavadas e as lamínulas foram retiradas dos poços e vertidas em lâminas de histologia contendo uma gota de meio de montagem Prolong Diamante® com marcador de núcleo DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) (Thermo Fisher Scientific, Oregon, EUA). As lâminas foram mantidas em repouso e protegidas da luz por 24 h previamente a visualização em microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram obtidas com aumento de 63 vezes em objetiva de imersão de óleo. Para visualização do DAPI foi utilizado o laser de comprimento de onda de 405 nm para excitação e a detecção da emissão foi monitorada na faixa de 409 a 514 nm, já para visualização da ZnF utilizou-se um laser de 638 nm para excitação e a emissão foi monitorada na banda de 640 a 700 nm.

#### **4.4.6 Avaliação do potencial antiangiogênico do bevacizumabe em células endoteliais**

O efeito antiangiogênico do bevacizumabe foi avaliado por meio da metodologia de *scratch* (LIANG; PARK; GUAN, 2007) em células endoteliais CRL-2922. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de  $3 \cdot 10^3$  células por poço e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingir 90% de confluência (2 dias). Após isso, foi realizado um “risco” no meio da monocamada celular com auxílio de ponteira de micropipeta de 1 µL estéril, criando-se um espaço onde a migração e proliferação celular foram observadas. Os poços foram lavados com solução salina 0,9% para remoção das células soltas e em seguida visualizados e fotografados na objetiva de 10 vezes por meio de uma câmera AxioCam acoplada ao microscópio óptico invertido (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As células foram então tratadas com solução de bevacizumabe ou nanoemulsão contendo bevacizumabe diluídas em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal, de modo que a concentração final de bevacizumabe nos poços fosse de 1 µg/mL. Nos tempos pré-determinados de 7, 12, 24 e 72 h os poços foram novamente fotografados para acompanhamento do crescimento das células e fechamento do “risco”. As imagens obtidas foram processadas utilizando-se o *software Image J* no qual foi possível calcular a distância entre um lado e outro do “risco” e desta forma obteve-se a média e o DP da distância para cada um dos tratamentos nos respectivos tempos de incubação e a partir disso, considerando-se a distância no tempo 0 como 100%, calculou-se a porcentagem de inibição do fechamento do espaço entre as células em função do tempo. Os

tratamentos foram comparados com um grupo controle tratado somente com meio de cultura DMEM suplementado.

#### 4.5 ENSAIOS *IN VITRO* DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA PASSIVA E IONTOFORÉTICA

Para os estudos de penetração cutânea, realizados com nanoemulsão e com emulsão de ZnF contendo 4,5  $\mu\text{g/mL}$  de fármaco, foram utilizadas células de difusão vertical com área de permeação de 0,95  $\text{cm}^2$  e peles provenientes de orelhas de porcos que foram retiradas imediatamente após os animais serem sacrificados. As orelhas foram obtidas de um abatedouro localizado na cidade de Ipuã (São Paulo, Brasil). A pele da superfície externa das orelhas foi cuidadosamente dissecada e armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  até a utilização. Imediatamente antes da realização dos experimentos de penetração a pele foi retirada do freezer, descongelada e dermatomizada com auxílio de dermatômetro (Nouvag, Goldach, Suíça) ajustado para a espessura de 700  $\mu\text{m}$ .

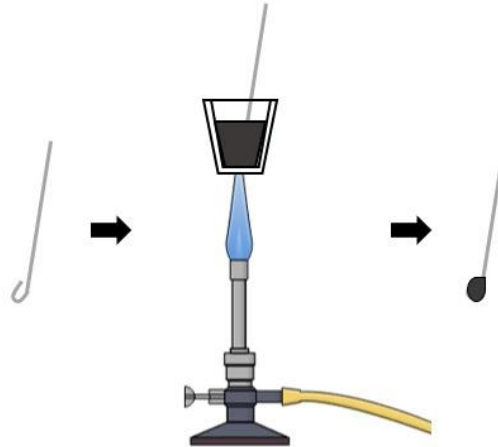
No início e ao final de cada um dos experimentos de penetração, para garantir a integridade do estrato córneo utilizado, sua resistividade elétrica foi determinada. Para isso, a célula de difusão vertical foi montada com a pele separando os compartimentos doador e receptor os quais foram preenchidos com tampão fosfato-salino isotônico 10 mM pH 7,4 (PBS). Eletrodos de Ag/AgCl foram colocados na solução doadora acima da pele e na solução receptora. Uma corrente elétrica alternada com tensão de 100 mV e frequência de 10 Hz foi aplicada, com o auxílio de um gerador de corrente (Agilent, California, EUA), sobre a pele e a intensidade da corrente elétrica que atravessou a pele foi medida com o auxílio de um multímetro (Minipa, São Paulo, Brasil). A resistência elétrica da pele foi calculada a partir da lei de Ohm, dividindo-se a tensão aplicada pela corrente elétrica que atravessou a pele. Por fim, o valor de resistividade foi determinado multiplicando-se o valor de resistência obtido pela área da pele disponível para a passagem de corrente (0,95  $\text{cm}^2$ ). Somente amostras de pele com valor de resistividade acima de 30  $\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$  foram utilizados nos experimentos.

##### 4.5.1 Eletrodos utilizados nos experimentos de iontoforese

Os eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl) que foram utilizados para aplicação da iontoforese foram preparados adicionando-se uma pequena quantidade de AgCl (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) em um cadinho de porcelana que foi aquecido

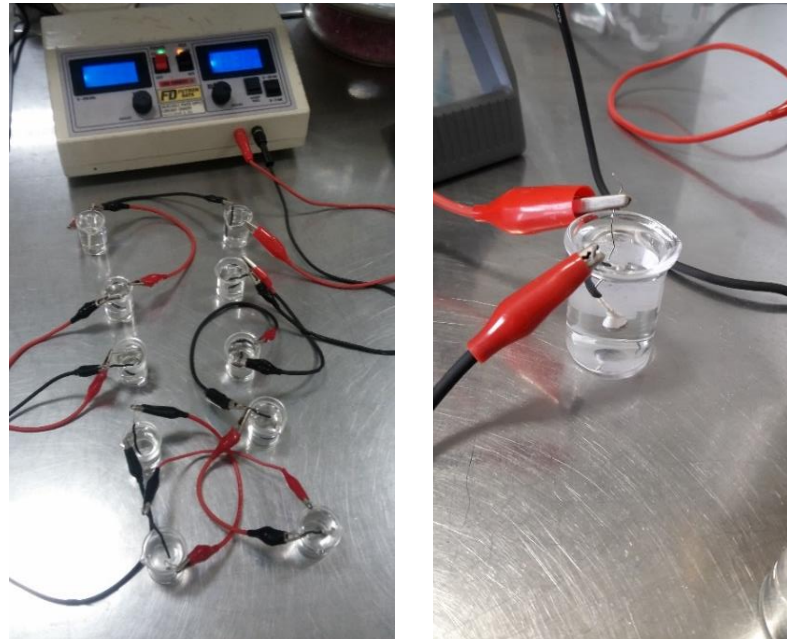
em bico de Bunsen até a completa fusão do AgCl. Um pedaço de fio de prata foi cortado em pedaços menores de tamanhos iguais nos quais uma das pontas foi levemente dobrada, conforme representado na Figura 13 e submersa no AgCl fundido para a formação do eletrodo negativo (cátodo) de AgCl após resfriamento.

Figura 13 – Representação do procedimento para formação do eletrodo negativo (cátodo).



O eletrodo positivo de Ag (ânodo) foi obtido por meio da reação de redução do AgCl em solução salina 0,9%, com auxílio de um fio de platina e de um gerador de corrente elétrica (Futron Data, São Paulo, Brasil). Um circuito em série com vários eletrodos foi montado de modo que o terminal positivo do gerador foi conectado a um fio de platina e o terminal negativo foi conectado ao eletrodo negativo de AgCl que após a passagem de uma corrente elétrica de 0,2 mA durante 24 h foi reduzido e convertido em um eletrodo positivo de Ag (Figura 14).

Figura 14 – Fotografias do preparo em série de eletrodos de Ag em solução de NaCl 0,9%.



#### 4.5.2 Avaliação da estabilidade das formulações contendo ZnF frente a aplicação de corrente elétrica

Para avaliar a estabilidade da emulsão e da nanoemulsão de ZnF frente a aplicação da iontoforese, 1 mL de cada uma das formulações contendo cerca de 4,5  $\mu\text{g}$  de ZnF foram colocados em béqueres juntamente com os eletrodos de Ag e AgCl que foram ligados a um gerador de corrente elétrica (Digital SourceMeter2400 (Keithley, Oregon, EUA). Em seguida as formulações foram submetidas a passagem de uma corrente elétrica constante de 0,5 mA durante 1 h (período máximo de duração dos experimentos de penetração realizados). O tamanho médio das gotículas da emulsão e da nanoemulsão bem como a concentração de ZnF foram determinados antes e após a aplicação da corrente elétrica de acordo com as metodologias descritas nos itens 4.3.1 e 4.3.6.

#### 4.5.3 Experimento *in vitro* de penetração passiva de ZnF a partir da nanoemulsão e da emulsão

As amostras de pele com resistividade elétrica maior do que 30  $\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$  foram montadas nas células de difusão vertical, com área difusional de 0,95  $\text{cm}^2$ , com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor. As formulações (emulsão e nanoemulsão) foram aplicadas no compartimento doador numa dose infinita de cerca de 4,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ZnF ( $n=4$  para



cada formulação). O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de tampão PBS isotônico (10 mM, pH 7,4) contendo 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma, Missouri, EUA) para garantir as condições *sink*. A solubilidade da ZnF no meio receptor (PBS + 1% de SDS) determinada experimentalmente foi de 0,1 µg/mL. O meio receptor foi mantido sob constante agitação a 300 rpm durante o experimento.

Após 30 ou 60 minutos de contato das formulações com a pele, as células de difusão foram desmontadas, o meio receptor foi coletado e a superfície da pele em contato com as formulações foi cuidadosamente lavada com água destilada para remover o excesso de formulação e secada delicadamente com papel toalha. Após isso, a pele foi presa em uma superfície lisa com o estrato córneo voltado para cima e o fármaco foi extraído desta camada pela técnica do *tape stripping* utilizando fita adesiva *Scotch shipping packaging* da 3M (3M, São Paulo, Brasil). O processo foi realizado utilizando 15 pedaços de fita que foram coladas no estrato córneo e retiradas sucessivamente. As fitas contendo o estrato córneo foram imersas em 5 mL de DMSO, agitadas em vórtex por 2 min e sonicadas por 30 min em banho ultrassônico. O DMSO contendo a ZnF extraída do estrato córneo foi então filtrado através de uma membrana PTFE de 0,45 µm e analisado em fluorímetro através do método analítico descrito no item 4.1 para determinar a concentração de ZnF no estrato córneo.

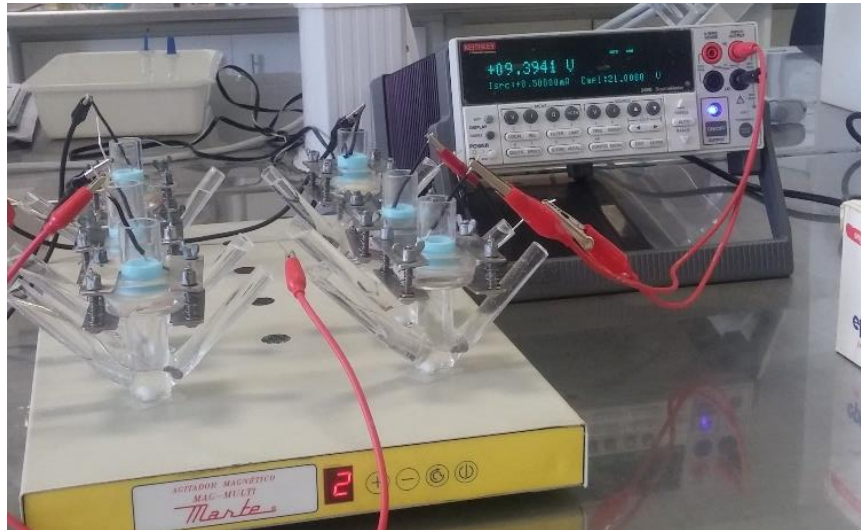
Após a retirada do estrato córneo, a pele remanescente contendo as camadas da epiderme e da derme (E+D) foi cortada em pequenos pedaços dentro de um tubo cônico onde foram adicionados 3 mL de DMSO para a extração da ZnF. O tubo foi agitado em vórtex por 2 min, homogeneizado em ultraturrax por 1 min à 13500 rpm e por fim sonicado em banho ultrassônico por 30 min. Após este procedimento de extração as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi filtrado em membrana PTFE 0,45 µm e analisado por espectrofluorimetria utilizando os parâmetros do método analítico 4.1 para determinar a concentração de ZnF na E+D através da curva matrizada.

#### **4.5.4 Experimento *in vitro* de penetração iontoforética de ZnF a partir da nanoemulsão e da emulsão**

A pele foi igualmente montada na célula de difusão conforme descrito anteriormente. A nanoemulsão ou a emulsão de ZnF (n=4) na dose infinita de cerca de 4,5 µg/mL foram colocadas no compartimento doador e o compartimento receptor foi preenchido com tampão PBS isotônico com 1% de SDS e mantido sob agitação.

Para aplicação da iontoforese anódica, os eletrodos de Ag (ânodo) e AgCl (cátodo) foram inseridos nos compartimentos doador e receptor, respectivamente (Figura 15).

Figura 15 – Fotografia do experimento de penetração *in vitro* com aplicação da iontoforese.



Uma corrente elétrica constante de densidade de 0,5 mA/cm<sup>2</sup> foi aplicada por 30 ou 60 min através de uma fonte geradora Digital SourceMeter2400 (Keithley, Oregon, EUA). No fim dos experimentos, o estrato córneo foi separado do restante da pele e a ZnF foi extraída e quantificada da mesma maneira do experimento passivo (item 4.5.3).

O número de íons necessários para a passagem da corrente elétrica de 0,5 mA/cm<sup>2</sup> para o tempo máximo de 60 min do experimento foi calculado de acordo com a Equação 8:

$$T = \frac{i \cdot t}{F} \quad (\text{Equação 8}),$$

onde  $T$  é o número de moles necessários para transportar a corrente elétrica,  $i$  é a corrente elétrica aplicada expressa em amperes,  $t$  é o tempo de aplicação de corrente elétrica em segundos e  $F$  é a constante de Faraday (96500 C).

#### 4.5.5 Análise estatística

Os estudos de penetração cutânea *in vitro* foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido de pós teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4.6 ESTUDOS *IN VIVO*

### 4.6.1 Animais

Camundongos C57BL/6, do sexo feminino, com idade entre 6 a 8 semanas (18-22 g de massa corpórea) foram adquiridos do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP (FCFRP-USP), em cama de maravalha, trocada 3 vezes por semana. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada e mantida entre 20 e 24°C, iluminação artificial de 12 h claro e 12 h escuro, umidade natural, densidade populacional de 6 animais/caixa (dimensões da caixa = 30,0 (L1) x 18,0 (L2) x 13,0 cm (A)) e recebendo água e comida *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (Autorização nº 17.5.344.60.00).

Após os experimentos os animais foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical com anestesia prévia por via intraperitoneal de cetamina e xilasina na dose de 150 mg/kg e 16 mg/kg respectivamente, conforme preconizado pelo CEUA do Campus de Ribeirão Preto - USP. A morte foi confirmada pela ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda de cor de mucosas.

#### **4.6.2 Implantação do tumor**

Um dia antes da indução do tumor, o dorso dos animais foi tricotomizado utilizando um aparador de pêlos (Wahl, Illinois, EUA). Para indução do tumor, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 100 µL de solução salina contendo 30% de uma mistura na proporção de 2:1 de cetamina (Cetamin 10% - Syntec, São Paulo, Brasil) e xilasina (Xilazin 2% - Syntec, São Paulo, Brasil) e em seguida 10<sup>6</sup> células B16F10 de melanoma murino (200 µL) dispersas em DMEM foram injetadas subcutaneamente no dorso dos camundongos (OVERWIJK; RESTIFO, 2001). Os tratamentos com as formulações foram iniciados de 5 a 10 dias após a indução tumoral, dependendo do objetivo do estudo, como especificado nos próximos itens.

#### **4.6.3 Definição do tempo de aplicação da iontoforese e avaliação da distribuição da ZnF no tumor**

Para avaliar a penetração e distribuição da ZnF no tumor com a aplicação da iontoforese, a nanoemulsão de ZnF foi aplicada sobre o melanoma 10 dias após a inoculação das células (tumor com volume aproximado de 100 ± 50 mm<sup>3</sup>). Os camundongos foram divididos em três grupos de dois animais e a iontoforese da nanoemulsão de ZnF foi aplicada por 5 min (Grupo 1), 15 min (Grupo 2) ou 30 min

(Grupo 3), sempre a partir do ânodo (iontoforese anódica), com densidade de corrente elétrica de  $0,5 \text{ mA/cm}^2$ . Antes do tratamento os animais foram anestesiados com  $100 \mu\text{L}$  da solução salina contendo 30% da mistura de cetamina e xilasina (2:1) utilizada para a indução tumoral.

A nanoemulsão de ZnF foi aplicada topicamente preenchendo um compartimento de plástico adaptado (seringa de 5 mL cortada) que foi fixado sobre a pele que circunda o tumor com graxa de silicone (Synth, São Paulo, Brasil). O eletrodo positivo (ânodo) foi imerso na nanoemulsão enquanto que um patch comercial contendo um eletrodo negativo (lomed, Utah, EUA) foi fixado na cauda do camundongo (contra-eletrodo), de acordo com a Figura 16. Os eletrodos foram conectados ao gerador de corrente e a iontoforese anódica de  $0,5 \text{ mA/cm}^2$  foi aplicada durante os tempos definidos.

Figura 16 - Fotografia do tratamento tópico da nanoemulsão com aplicação de iontoforese anódica nos camundongos com melanoma implantado.



Ao final do tratamento os animais foram sacrificados conforme descrito no item 4.6.1 e a pele e o tumor foram removidos e imersos em suportes contendo meio de congelamento Tissue-Tek O.C.T (Sakura, California, EUA) e preservados em congelador a  $-80^\circ\text{C}$ . Criosecções de  $20 \mu\text{m}$  de espessura perpendiculares a superfície da pele foram realizadas nos blocos congelados de pele e tumor com auxílio de um criostato Leica CM1860 (Leica, Illinois, EUA). Os cortes foram colocados sobre lâminas histológicas silanizadas (Knittel Glass, Brunsvique, Alemanha) e visualizados

em aumento de 20 vezes utilizando microscópio confocal Leica TCS SP8 operando com um laser de 638 nm para excitação da ZnF. A emissão da fluorescência foi monitorada na faixa de 640 a 700 nm. Cortes de amostras de pele e tumor de animais controle, não tratados, foram utilizadas para ajustar os parâmetros do microscópio de modo que a autofluorescência dos tecidos não interferisse na visualização e análise da distribuição da ZnF.

#### 4.6.4 Avaliação do efeito da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe na TFD do melanoma

A nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe desenvolvida foi administrada por duas diferentes vias; intratumoral e tópica, sendo que a administração tópica foi realizada juntamente com a aplicação de 30 min de iontoforese anódica na densidade de 0,5 mA/cm<sup>2</sup>. Os tratamentos foram iniciados 5 dias após a inoculação das células tumorais, quando o tumor apresentava um volume aproximado de 40 ± 10 mm<sup>3</sup>.

Os animais tratados por via intratumoral foram divididos em 7 diferentes grupos, já os animais tratados por via tópica foram divididos em 8 grupos, conforme esquematizado na Figura 17 e descrito na Tabela 3. O número de animais por grupo foi definido com base na análise estatística por *Power Analysis* com o auxílio do software Openepi® e resultou numa amostragem de 5 animais por grupo.

Figura 17 – Esquema dos grupos de tratamento do melanoma para cada uma das vias de administração.



Antes de cada tratamento os animais foram anestesiados com 100 µL de solução salina contendo 30% de uma mistura na proporção de 2:1 de cetamina (10%) e xilasina (2%).

Para o tratamento por via intratumoral, uma agulha de 26G (0,45 x 13mm)

acoplada a uma seringa de 1 mL foi utilizada para administrar 100 µL de nanoemulsão ou tampão, dependendo do grupo, dentro da massa tumoral visível. A dose de ZnF e bevacizumabe administradas por esta via foi de 0,2 e 4 mg/Kg, respectivamente.

Para o tratamento tópico com iontoforese, a quantidade de nanoemulsão aplicada foi de 2 mL contendo 50 µg/mL de ZnF e 1 mg/mL de bevacizumabe. A aplicação tópica da formulação com a passagem da corrente elétrica foi realizada conforme descrito no item 4.6.3 e demonstrado na Figura 16.

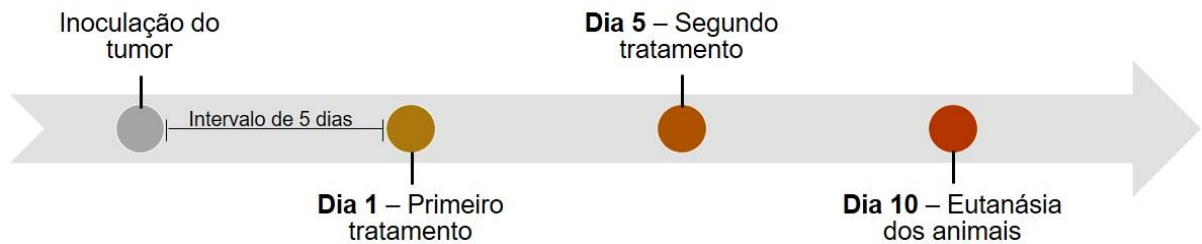
Tabela 3 - Descrição resumida dos grupos e tratamentos.

Via de administração		Abreviatura dos grupos	Tratamento
Injeção intratumoral		CN (Controle)	100 µL de tampão fosfato 10mM pH7,4
		NB (Nanoemulsão branca)	100 µL de nanoemulsão branca
		NB+laser	100 µL de nanoemulsão branca + laser a 670 nm (100 J/cm <sup>2</sup> )
		NF (Nanoemulsão de ZnF)	100 µL de nanoemulsão contendo ZnF (0,2 mg/kg)
		NF+laser	100 µL de nanoemulsão contendo ZnF (0,2 mg/kg) + laser a 670 nm (100 J/cm <sup>2</sup> )
		NFB (Nanoemulsão de FZn e Bevacizumabe)	100 µL de nanoemulsão contendo ZnF (0,2 mg/kg) e Bevacizumabe (4 mg/kg)
		NFB+laser	100 µL de nanoemulsão contendo ZnF (0,2 mg/kg) e Bevacizumabe (4mg/kg) + laser a 670 nm (100 J/cm <sup>2</sup> )
Aplicação tópica	Sem iontoforese	CN1	2 mL de tampão fosfato 10 mM pH7,4
	Com aplicação da iontoforese 0,5mA/cm <sup>2</sup>	CN2 NB	2 mL de tampão fosfato 10 mM pH7,4 2 mL de nanoemulsão branca
		NB+laser	2 mL de nanoemulsão branca + laser a 670 nm (100J /cm <sup>2</sup> )
		NF	2 mL de nanoemulsão contendo ~40 µg/mL ZnF
		NF+laser	2 mL de nanoemulsão contendo ~40µg/mL ZnF + laser a 670 nm (100 J/cm <sup>2</sup> )
		NFB	2 mL de nanoemulsão contendo ~40 µg/mL FZn e 1 mg/mL de Bevacizumabe
		NFB+laser	2 mL de nanoemulsão contendo ~40 µg/mL FZn e 1 mg/mL de Bevacizumabe + laser a 670 nm (100 J/cm <sup>2</sup> )

O regime de tratamento, tanto por via intratumoral como tópica, foi constituído

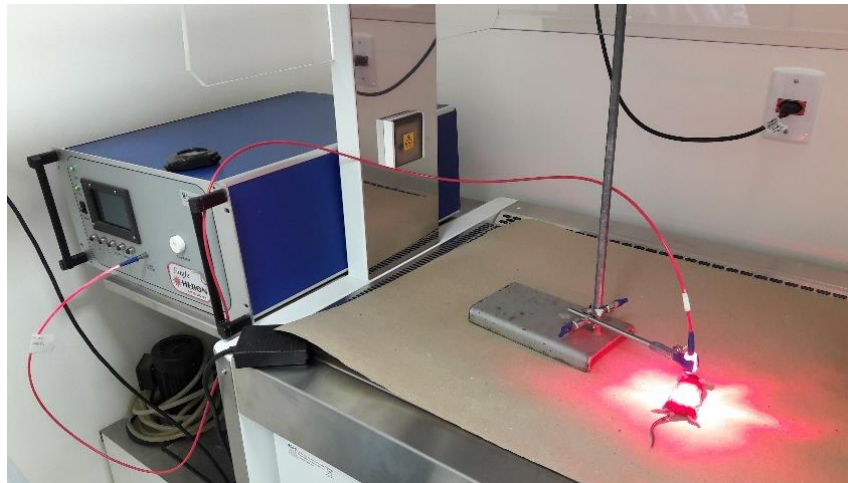
de duas administrações, após 5 e 10 dias da inoculação do tumor (Figura 18). Ou seja, uma no primeiro dia de tratamento e outra após 5 dias. Os animais foram eutanasiados conforme descrito no item 4.6.1 após 10 dias do início do primeiro tratamento.

Figura 18 – Esquema do regime de tratamento utilizado.



Para os animais submetidos à TFD, um sistema de laser de diodo Eagle (Quantum Tech, São Paulo, Brasil) operando em 670 nm acoplado a uma fibra óptica foi utilizado para a aplicação da dose de luz de  $100 \text{ J/cm}^2$  sobre o local do tumor imediatamente após a injeção intratumoral ou os 30 min da iontoforese (Figura 19). Para a aplicação do laser após a iontoforese, a formulação foi removida e a pele dos animais foi secada com papel absorvente.

Figura 19 – Fotografia do sistema de laser utilizado para a irradiação dos animais a 670 nm para a TFD.



A fibra óptica foi posicionada a uma distância de 3 cm do camundongo. Antes de cada tratamento o laser era calibrado com o auxílio de um radiômetro posicionado exatamente a mesma distância utilizada para irradiar os animais. Após verificar a

potência e a irradiância do laser, o tempo de aplicação necessário para fornecer a dose de luz estabelecida (100 J/cm<sup>2</sup>) era definido com base na Equação 7. No decorrer de todos os dias de tratamento o tempo de aplicação do laser variou de 5 a 8 min e a dose de luz aplicada foi sempre a de 100 J/cm<sup>2</sup>.

#### 4.6.4.1 Avaliação do tamanho tumoral

O crescimento tumoral foi acompanhado três vezes por semana após o início do tratamento (dias 5, 8, 10, 13 e 15) até o final do estudo, com o auxílio de paquímetro digital (Zaas Precision, São Paulo, Brasil). O volume tumoral (mm<sup>3</sup>) foi calculado de acordo com a Equação 9:

$$V = \frac{d^2 \cdot D}{2} \quad (\text{Equação 9}),$$

onde  $d$  e  $D$  correspondem ao menor e maior diâmetro em mm, respectivamente (LABALA et al., 2017; MONGE-FUENTES et al., 2017).

Para análise dos resultados, calculou-se a porcentagem do aumento do tumor em cada um dos dias de monitoração. Para isso, considerou-se a média do tamanho do tumor de cada grupo no início do tratamento como 100% e calculou-se a porcentagem da diferença entre este valor inicial e o valor de tamanho médio obtido em cada um dos dias de medida.

#### 4.6.4.2 Monitoramento da massa corpórea dos animais

A massa corpórea dos animais foi aferida três vezes por semana (dia 0, 3, 5, 8 e 10) utilizando-se balança digital.

#### 4.6.4.3 Coleta e preparo de amostras

Após eutanásia (item 4.6.1), os tumores foram retirados com auxílio de tesouras cirúrgicas e em seguida pesados em balança semi-analítica (Marte Científica, São Paulo, Brasil) e imersos em suportes contendo meio de congelamento Tissue-Tek O.C.T que foram preservados em congelador a -80°C até utilização. Criosecções de 15 µm de espessura foram realizadas nos blocos congelados de tumor utilizando um criostato Leica CM1860. Os cortes foram coletados sobre lâminas histológicas silanizadas e armazenados em congelador para posteriores análises histológicas e imunohistoquímicas.

Os órgãos com suspeita de metástase aparente (com coloração escura) foram também retirados, como baço, estômago e fígado. Os mesmos foram colocados em cassetes (Sakura, California, EUA) que foram imersos em solução de PBS com 10%



de formaldeído, e acondicionados a 4°C por 24 h. Para a preparação dos cortes histológicos, as amostras foram desidratadas passando por uma série crescente de misturas etanólicas (50, 70, 80, 90 e 95% de etanol, uma hora em cada uma das soluções) e por três banhos em etanol absoluto (1 h cada). Em seguida foram clarificadas através da imersão em uma mistura de etanol:xilol (50:50) e em três banhos de xilol, de 1 h cada. Por fim, os cassetes foram submetidos a dois banhos de parafina a 60°C (2 h cada) e incluídos em blocos. Cortes de 6 µm foram obtidos em micrótomo Leica Jung RM2065 (Leica, Wetzlar, Alemanha) e coletados em lâminas silanizadas para posteriores análises histológicas.

#### *4.6.4.4 Avaliação histológica do tumor e demais órgãos utilizando coloração com hematoxilina e eosina (HE)*

Para coloração dos órgãos emblocados em parafina, os cortes obtidos passaram primeiramente pelo processo de desparafinização em xilol (2 banhos de 5 min cada), seguido de hidratação em uma série decrescente de misturas etanólicas (absoluto, 95, 90, 85, 80, 70 e 50%) e lavagem em água corrente. Já os cortes dos tumores que foram emblocados em meio de congelamento Tissue-Tek passaram diretamente para as etapas de coloração.

A coloração foi iniciada pela hidratação das lâminas em dois banhos de água destilada e logo após imersas em solução de hematoxilina de Harris por 2 min. As lâminas foram novamente lavadas em água destilada e submetidas a coloração com eosina por 2 min. O excesso de corante foi removido com uma mistura de etanol 95% e ácido acético 1% e os cortes foram novamente desidratados por meio de uma série de lavagens em etanol 95%, etanol absoluto e xilol. Por fim as lâminas foram montadas com meio de montagem Tissue Mount - *Glas™ Mounting Media* (Sakura, California, EUA) e analisadas em microscópio invertido utilizando o *software* Axion Vision Release 4.8.2.0. (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha).

Nas lâminas dos órgãos avaliou-se a existência ou não de metástase do tumor pela verificação de células neoplásicas de melanoma através da análise de um patologista (BEACK et al., 2015; MONGE-FUENTES et al., 2017).

#### *4.6.4.5 Avaliação da morte celular por apoptose no tumor pelo ensaio do TUNEL*

A resposta apoptótica da massa tumoral em função do tratamento foi avaliada pela detecção das fragmentações do DNA celular através do ensaio do TUNEL. Este ensaio se baseia na marcação da ponta terminal dos ácidos nucleicos de células apoptóticas com fluoresceína-12-dUTP por meio da ação da enzima deoxinucleotidil

terminal transferase (rTdT) (BEACK et al., 2015). As lâminas contendo os cortes histológicos dos tumores foram lavadas em PBS e submetidas as etapas descritas no protocolo do kit comercial DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL System utilizado (Promega Corporation, Wisconsin, EUA). Além da marcação específica dos núcleos de células em processo de apoptose pelo protocolo do kit, todos os núcleos celulares foram marcados com DAPI presente no meio de montagem das lâminas. As lâminas foram visualizadas em microscópio confocal no aumento de 40 vezes, sendo que para visualização do DAPI foi utilizado o laser de comprimento de onda de 405 nm para excitação e a detecção da emissão foi monitorada na faixa de 413 a 493 nm, já para visualização da fluoresceína utilizou-se um laser de 488 nm e a emissão foi monitorada na faixa de 500 a 540 nm.

Cortes de amostras de tumor não incubadas com a enzima rTdT e, portanto, não marcadas com a fluoresceína, foram utilizadas para ajustar os parâmetros do microscópio de modo que a autofluorescência dos tumores não interferisse na visualização e análise das amostras.

#### *4.6.4.6 Análise estatística*

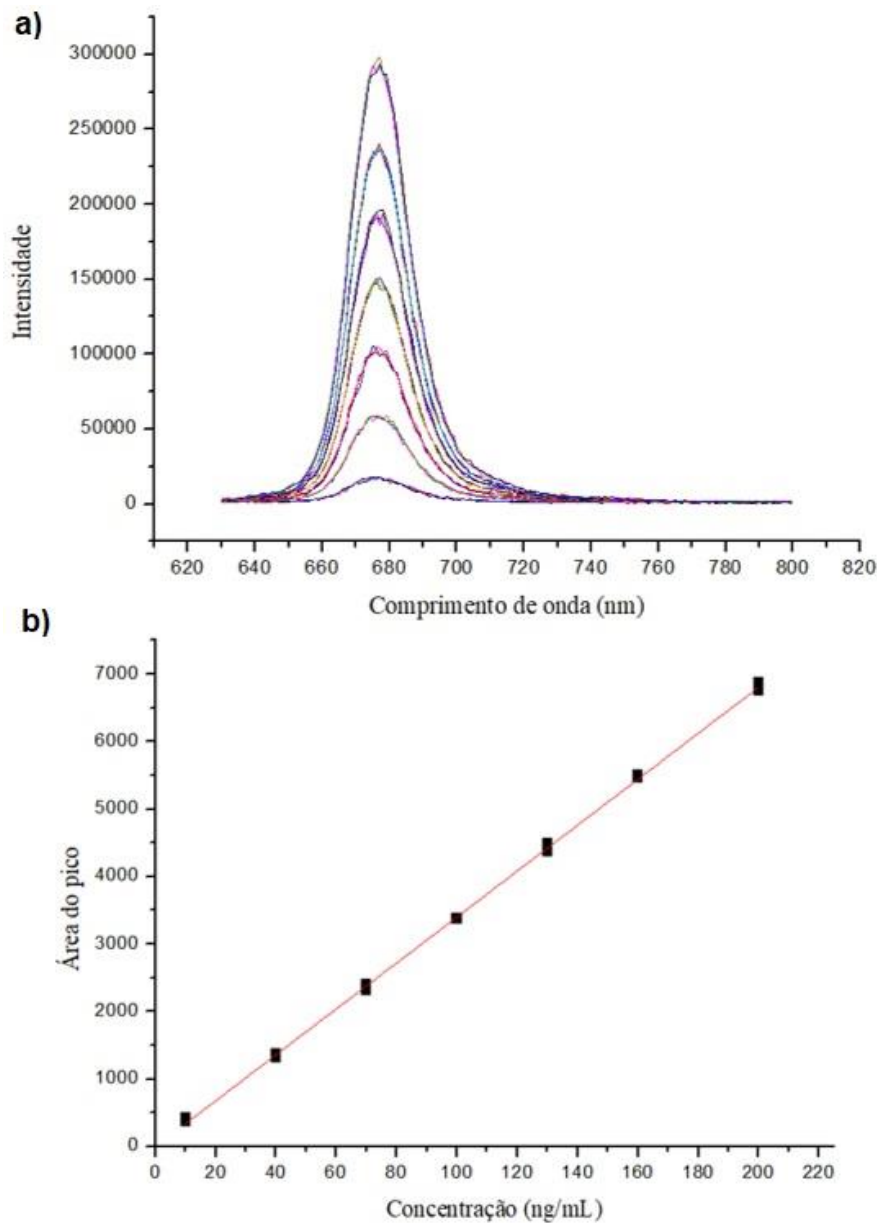
As comparações das médias de duas populações foram realizadas empregando teste-t de Student e no caso de três ou mais populações para comparação, os dados foram avaliados por Análise de Variância (Two-way ANOVA), seguidos do pós teste de Tukey, Dunnett ou Bonferroni, conforme o caso. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad InStat 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA) e foram considerados significativos valores de  $p$  menores ou iguais a 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ZnF NAS FORMULAÇÕES E NA PELE

A Figura 20 mostra os espectros de emissão de fluorescência de soluções de ZnF em DMSO em diferentes concentrações e a curva analítica obtida a partir da área do pico de intensidade de fluorescência para cada concentração.

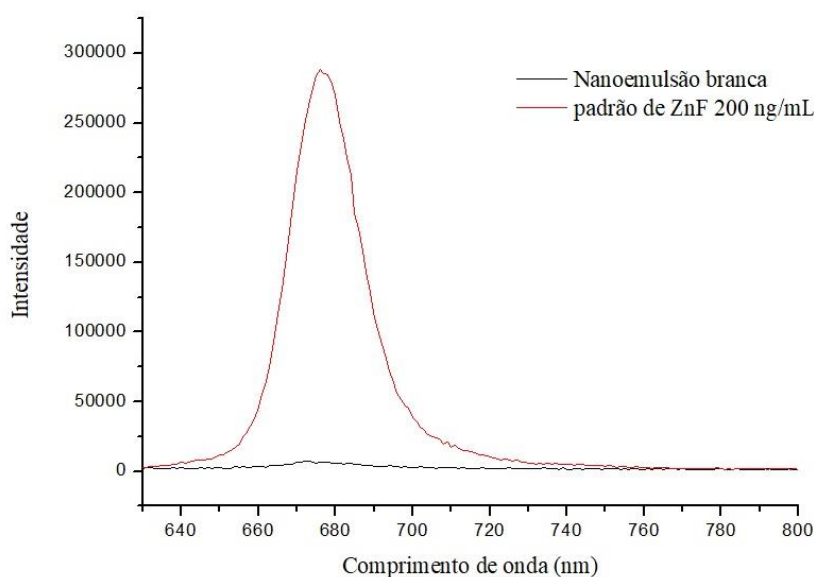
Figura 20 - Linearidade do método. a) Espectros de emissão de fluorescência obtidos através das diferentes concentrações de ZnF em DMSO (10-200ng/mL). b) Curva analítica de ZnF em DMSO (n=3). Equação da reta:  $y = 34,03 x + 4,325$ ;  $r = 0,999$ .



A curva analítica construída (Figura 20b) gerou um valor do coeficiente de correlação linear de 0,999 bem próximo de 1 indicando, portanto, que o método foi linear no intervalo de concentração utilizado. A equação da reta foi definida como  $y = 34,03 x + 4,325$ , onde  $y$  é a área do pico de fluorescência e  $x$  é a concentração de ZnF em ng/mL.

A Figura 21 mostra a seletividade do método para a ZnF quando incorporada na nanoemulsão. Pode-se observar que a solubilização da nanoemulsão branca em DMSO resulta em um espectro de emissão de fluorescência sem pico na região de emissão da ZnF, indicando a especificidade e seletividade do método para o intuito pretendido.

Figura 21 - Comparação dos espectros de emissão de fluorescência de uma solução padrão de FZn a 200 ng/mL em DMSO e de uma nanoemulsão branca diluída em DMSO.



A Tabela 4 mostra os resultados obtidos no estudo de exatidão do método.

Tabela 4 - Resultados da exatidão para os padrões de ZnF em DMSO (n=5).

Concentração teórica (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Exatidão (%)
10	9,72 ± 0,09	97,25 ± 2,75
100	98,84 ± 0,62	98,84 ± 1,16
200	198,13 ± 0,50	99,06 ± 0,93

Resultados expressos como média ± desvio padrão

Todas as concentrações analisadas apresentaram porcentagem de recuperação entre 97 e 99% (Tabela 4), bem como coeficiente de variação menor do que 5%, estando de acordo com o recomendado pela literatura vigente (ICH, 2005). Estes valores demonstram a concordância entre os resultados obtidos experimentalmente e os valores teóricos e permitem inferir que os valores de concentração que forem gerados a partir da análise das amostras por este método estarão muito próximos do valor real (baixa porcentagem de erros).

A Tabela 5 mostra os resultados de precisão intracorrída (repetibilidade) e intercorrídas (precisão intermediária).

Tabela 5 - Resultados dos testes de precisão intracorrída e intercorrída para amostras de ZnF em DMSO (n=5).

<b>PRECISÃO INTRA-CORRIDA</b>				
<b>Concentração teórica (ng/mL)</b>	<b>Concentração medida</b>		<b>CV (%)</b>	
	<b>(ng/mL)</b>			
<b>10</b>	10,23 ± 0,39			3,77
<b>100</b>	93,89 ± 0,47			0,50
<b>200</b>	190,44 ± 1,22			0,64
<b>PRECISÃO INTER-CORRIDA</b>				
<b>Concentração teórica (ng/mL)</b>	<b>Concentração medida 1º dia (ng/mL)</b>	<b>Concentração medida 2º dia (ng/mL)</b>	<b>Concentração medida 3º dia (ng/mL)</b>	<b>CV (%)</b>
<b>10</b>	10,23 ± 0,39	9,44 ± 0,44	9,83 ± 0,29	4,00
<b>100</b>	93,89 ± 0,47	89,59 ± 1,51	91,84 ± 1,11	2,35
<b>200</b>	190,44 ± 1,22	180,53 ± 0,85	183,15 ± 0,76	2,78

Resultados expressos como média ± desvio padrão

Pode-se observar na Tabela 5 que o CV de todas as amostras analisadas se manteve abaixo de 4. Desta forma, esses resultados confirmam a habilidade do método em determinar com precisão a concentração de ZnF em DMSO.

Os valores de LD e LQ foram calculados a partir do desvio padrão de resposta e da inclinação (*slope*) obtido a partir da regressão linear da curva de calibração. Desta forma, o LD obtido para o método desenvolvido foi de 1,14 ng/mL e o LQ de 3,8 ng/mL, valores que denotam alta sensibilidade do método e confiabilidade dos resultados para análises de concentrações baixas do analito,

como é o caso da quantificação de ZnF em ensaios de penetração *in vitro*.

### 5.1.1 Curva matrizada para quantificação de ZnF na pele de orelha de porco

A curva analítica construída a partir de concentrações conhecidas de FZn em matriz de pele de porco gerou um valor de coeficiente de correlação linear de 0,991. O ICH preconiza que o valor de  $r$  para a análise em amostras biológicas seja maior que 0,98, portanto, a curva foi linear no intervalo de concentração utilizado, sendo a equação da reta para a quantificação definida como  $y = 27,15x + 756,4$ . A verificação da linearidade do método garantiu a confiabilidade no uso desta equação da reta para a quantificação da concentração de ZnF em pele.

### 5.1.2 Estudo de recuperação de ZnF da pele

O teste de recuperação da ZnF foi realizado com o intuito de verificar se o fármaco seria adequadamente extraído da pele pelo protocolo de extração empregado. O DMSO foi escolhido como solvente extrator por se tratar de um solvente capaz de solubilizar altas concentrações de ZnF, além de ter sido o solvente utilizado para validação do método analítico descrito anteriormente.

Os resultados obtidos após a contaminação da pele com três diferentes concentrações de ZnF e extração com DMSO estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do estudo de recuperação de ZnF da pele dermatomizada de orelha de porco utilizando DMSO (n=3).

Concentração teórica (ng/mL)	Concentração de ZnF extraída da pele (ng/mL)	Porcentagem de recuperação
40	32,1 ± 1,8	80,2 ± 4,4
100	94,6 ± 4,7	94,6 ± 4,7
200	190,1 ± 3,6	95 ± 1,8

Resultados expressos como média ± desvio padrão

Os resultados demonstram que, dentro das condições de extração estabelecidas, o solvente empregado (DMSO) foi capaz de extrair a ZnF da pele de orelha de porco apresentando valores de recuperação acima de 80%. Esta análise garante a confiabilidade da detecção de ZnF retida na pele após os experimentos de penetração cutânea *in vitro*.

## 5.2 OBTENÇÃO DA NANOEMULSÃO E CARACTERIZAÇÃO

A Tabela 7 apresenta o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das diferentes formulações preparadas de acordo com a composição descrita na Tabela 2.

Tabela 7 - Diâmetro das gotículas e índice de polidispersão (PDI) determinados por DLS, e potencial zeta das diferentes nanoemulsões preparadas.

<b>Formulação*</b>	<b>TCM (%)</b>	<b>Proporção polissorbato 80 /TCM</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>
F1	7	0,71	97	0,27	35
F2	8	0,25	167	0,24	55
F3	10	0,4	164	0,24	35
F4	10	0,3	163	0,25	56
F5	15	0,3	182	0,17	48

\*Composição das formulações descritas na Tabela 2

Ressalta-se que nestes estudos iniciais as nanoemulsões foram, na maioria das vezes, preparadas em experimentos únicos, sem repetições, apenas para definir as proporções que gerassem os melhores resultados.

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 7, é possível observar que todas as formulações foram capazes de produzir gotículas de tamanho nanométrico, sendo que o mesmo variou de 97 a 182 nm. O menor valor de potencial zeta obtido foi o de 35 mV, portanto todas as formulações apresentaram potencial zeta positivo. Quanto ao PDI, a formulação F5 foi a que apresentou menor grau de polidispersão (0,17) e foi definida como a formulação ideal, de acordo com as características pretendidas, para os estudos subsequentes nos quais se incorporou os fármacos na nanoemulsão.

A Tabela 8 mostra as características físico químicas da emulsão e da nanoemulsão preparadas com a mesma composição de F5 em triplicata e incorporando-se ZnF.

Tabela 8 – Características físico químicas da emulsão e da nanoemulsão compostas por 15% de fase oleosa e água na fase aquosa (formulação F5 da Tabela 2).

CARACTERÍSTICAS	FORMULAÇÃO		
	Emulsão de ZnF	Nanoemulsão branca	Nanoemulsão de ZnF
Tamanho (nm) <sup>a</sup>	12,8.10 <sup>3</sup> ± 3,5.10 <sup>3</sup> *	177 ± 16	173 ± 21
PDI ou SPAN <sup>b</sup>	2,04 ± 0,3*	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,02
Potencial zeta (mV)	63 ± 1*	43 ± 2	43 ± 7
Ph	6,4 ± 0,4	5,6 ± 0,1*	6,4 ± 0,3

<sup>a</sup> tamanho médio determinado por difração a laser e DLS (intensidade) para a emulsão e a nanoemulsão, respectivamente. <sup>b</sup> PDI do tamanho obtido por DLS e SPAN do tamanho determinado por difração a laser. Valores expressos como média ± DP de 3 replicatas. \*indica diferença estatística entre os valores analisados por linha (ANOVA com pós teste de Tukey, p<0,05).

Conforme mostra a Tabela 8, as nanoemulsões preparadas utilizando ultrassom de baixa frequência apresentaram tamanho das gotículas em escala nanométrica e 70 vezes menor do que o tamanho das gotículas da emulsão. A faixa de distribuição do tamanho das gotículas da nanoemulsão foi estreita, resultando em um baixo valor de PDI, enquanto que a emulsão apresentou um alto valor de SPAN indicando uma variação ampla do tamanho das gotículas.

O potencial zeta da emulsão foi significativamente maior do que o da nanoemulsão de ZnF e da nanoemulsão branca (ANOVA, com pós teste de Tukey, p <0,05); no entanto, todas as formulações apresentaram carga positiva (catiônicas). Em termos de pH, o valor obtido para a emulsão e a nanoemulsão contendo ZnF foi de aproximadamente 6,4, diferentemente da nanoemulsão branca que apresentou valor de pH menor. A adição de fármaco na nanoemulsão não provocou alterações significativas no tamanho e no PDI da formulação e os valores foram semelhantes aos obtidos na formulação preliminar (F5).

A nanoemulsão foi capaz de incorporar uma concentração de 49,4 ± 6 µg/mL de ZnF, aproximadamente 2,5 vezes mais do que a emulsão, que incorporou apenas 18,5 ± 7,4 µg/mL. Como a ZnF tem coloração azul, esta diferença pode ser claramente observada pela visualização da diferença de cor das formulações (Figura 22).



Figura 22 – Aspecto macroscópico da emulsão (frasco da esquerda) e da nanoemulsão (frasco da direita) contendo ZnF.



As características da nanoemulsão e da emulsão preparadas de forma a obter a mesma concentração final de ZnF incorporada e contendo PBS na fase aquosa ao invés da água para a realização dos estudos *in vitro* de iontoforese estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9 – Características da emulsão e da nanoemulsão contendo aproximadamente 4,5 µg/mL de ZnF.

CARACTERÍSTICAS	FORMULAÇÃO	
	Emulsão de ZnF	Nanoemulsão de ZnF
Tamanho (nm) <sup>a</sup>	14,4.10 <sup>3</sup> ± 5,7.10 <sup>3*</sup>	176 ± 6
PDI ou SPAN <sup>b</sup>	2,4 ± 0,4*	0,17 ± 0,02
Potencial zeta (mV)	25 ± 4	24 ± 3
pH	7,19 ± 0,04	7,14 ± 0,02

<sup>a</sup> tamanho médio determinado por difração a laser e DLS (intensidade) para a emulsão e a nanoemulsão, respectivamente. <sup>b</sup> PDI do tamanho obtido por DLS e SPAN do tamanho determinado por difração a laser. Valores expressos como média ± DP de 3 replicatas. \*indica diferença estatística entre os valores analisados por linha (ANOVA com pós teste de Tukey, p<0,05).

A concentração exata de ZnF incorporada na emulsão e na nanoemulsão foi de 4,56 ± 0,05 µg/mL e 4,42 ± 0,49 µg/mL, respectivamente. Como a emulsão de ZnF obtida foi preparada somente para comparação nos estudos de penetração *in vitro*, ela não é uma formulação com estabilidade prolongada e por isso foi sempre utilizada imediatamente após seu preparo.

Pode-se observar nos resultados apresentados nas Tabelas 8 e 9 que não houve alteração significativa de tamanho e PDI quando a água da fase aquosa foi substituída pelo PBS. Como esperado, houve uma alteração do pH para aproximadamente 7 e uma diminuição do potencial zeta. Mas ambas nanoemulsão e emulsão apresentaram potencial zeta semelhante e ainda catiônico.

Da mesma forma, a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe preparada com PBS na fase aquosa no lugar da água não ocasionou nenhuma alteração significativa no valor do tamanho médio das gotículas, nem no PDI. Também não houve alteração significativa (t-test,  $p < 0,05$ ) na taxa de incorporação da ZnF, cuja concentração foi de  $43 \pm 2$   $\mu\text{g/mL}$ , correspondendo a aproximadamente 9% da concentração adicionada para seu preparo ( $500 \mu\text{g/mL} - 10 \text{ mg em } 20 \text{ mL}$ ). A concentração de bevacizumabe correspondeu a quantidade de bevacizumabe adicionado ( $1 \text{ mg/mL}$ ), já que este é incorporado na nanoemulsão já pronta e totalmente miscível com ela. O valor do potencial zeta, no entanto, reduziu significativamente, passando de  $+43 \text{ mV}$  para aproximadamente  $+22 \text{ mV}$  e o valor de pH ficou em torno de 7, como esperado em função do uso do tampão (Tabela 10).

Tabela 10 - Características físico químicas da nanoemulsão quando preparada com PBS na fase aquosa.

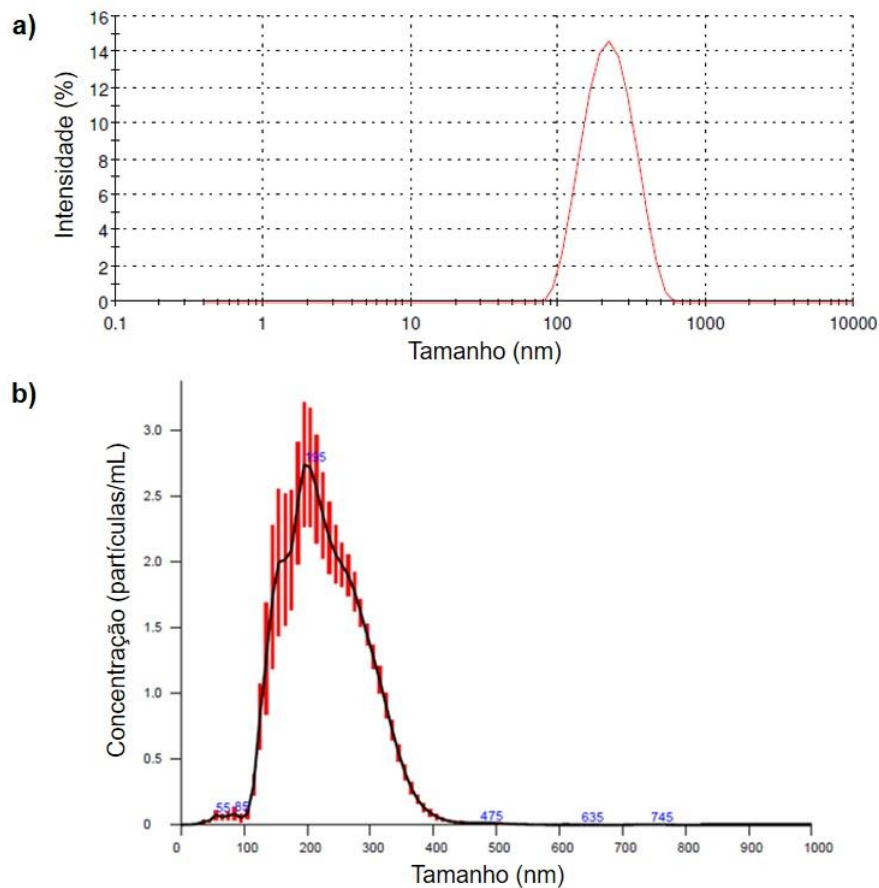
<b>Características da nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe</b>	
<b>Tamanho determinado por DLS (nm)</b>	$173,7 \pm 23,9$
<b>Tamanho determinado por NTA (nm)</b>	$216 \pm 63$
<b>PDI</b>	$0,171 \pm 0,008$
<b>Potencial zeta (mV)</b>	$22,5 \pm 5,2$
<b>Condutividade (mS/cm)</b>	$0,198 \pm 0,006$
<b>pH</b>	$6,96 \pm 0,02$
<b>Concentração de ZnF (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	$43 \pm 2$
<b>Concentração de bevacizumabe (mg/mL)</b>	1

Valores expressos como média  $\pm$  DP de 3 replicatas.

O tamanho médio das gotículas da nanoemulsão foi determinado utilizando, além do DLS, o NTA que permite avaliar também a concentração de gotículas na formulação. Os valores de tamanho médio obtidos por meio destas duas diferentes técnicas foram semelhantes, porém, na análise por NTA o tamanho médio das

gotículas foi discretamente maior e demonstrou uma maior polidispersão da amostra. Nela, 10% das gotículas (D10) apresentaram média de 133 nm, 50% apresentaram média de 198 nm e 90% apresentaram média de 297 nm. A concentração de gotículas da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe determinada por NTA foi de  $2,6 \cdot 10^{13} \pm 2,9 \cdot 10^{12}$  gotículas/mL. A Figura 23 apresenta os gráficos de distribuição de tamanho da nanoemulsão obtidos por DLS e NTA em função da intensidade e da concentração, respectivamente.

Figura 23 – Gráficos da distribuição do tamanho da nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe em PBS obtidos por DLS (a) e NTA (b).



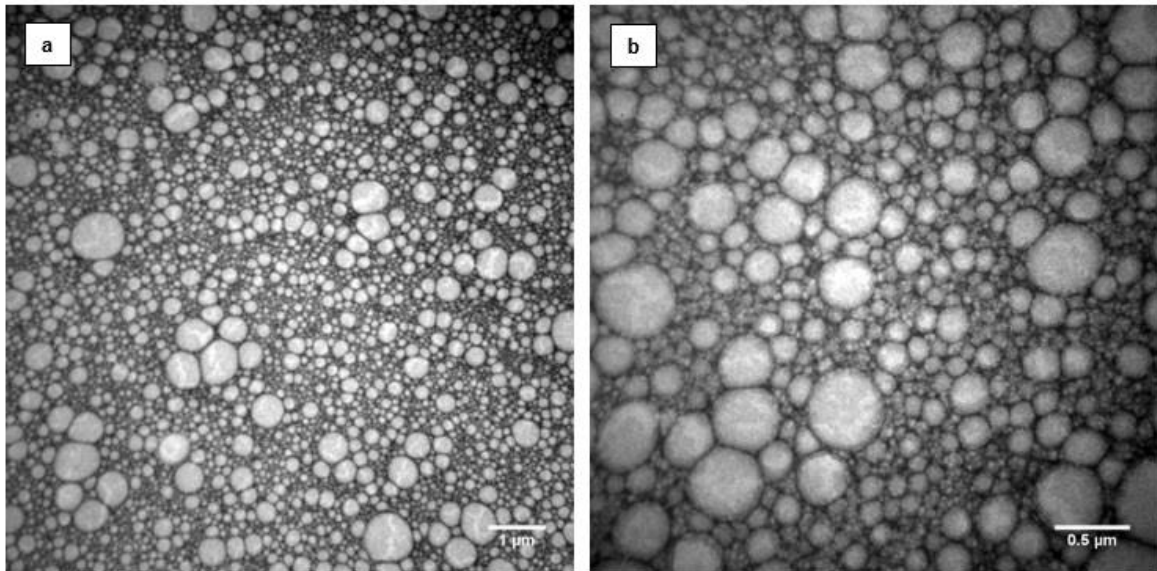
É possível observar que ambos os gráficos demonstram uma distribuição monomodal do tamanho das gotículas da nanoemulsão, ou seja, todas se encontram dentro de uma mesma faixa de tamanho, indicando uma alta homogeneidade da formulação.

Esta nanoemulsão preparada em PBS foi a formulação utilizada para os experimentos em cultura de células e *in vivo* e, portanto, foi avaliada também quanto

a estabilidade e morfologia.

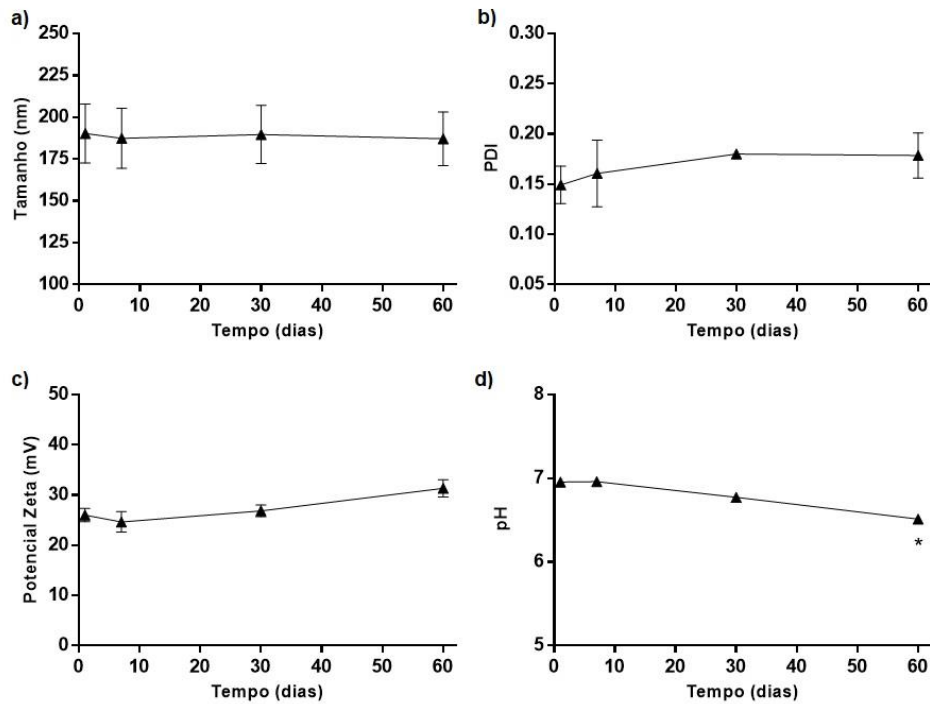
As micrografias obtidas a partir da microscopia eletrônica de transmissão (Figura 24) corroboraram com os resultados de tamanho médio obtidos pelas técnicas de DLS e NTA. Na Figura 24b podem ser observadas gotículas na faixa de aproximadamente 500 a 50 nm, mas predominantemente gotículas na faixa de 200 nm com formato esférico bem definido e uma alta concentração de gotículas.

Figura 24 – Microscopia eletrônica de transmissão da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe com contraste negativo de acetato de uranila 2% obtidas com aumento de a) 20000x; b) 50000x.



A Figura 25 mostra as características de tamanho, PDI, potencial zeta e pH das nanoemulsões, contendo ou não os fármacos, em função do tempo, armazenada a 4°C.

Figura 25 - Estabilidade da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe durante 60 dias de armazenamento à 4°C quanto ao: a) Tamanho, b) PDI, c) Potencial zeta e d) pH.



\*indica diferença estatística em relação ao tempo inicial ( $p < 0,05$ ) (ANOVA pareada seguido do pós teste de Tukey).

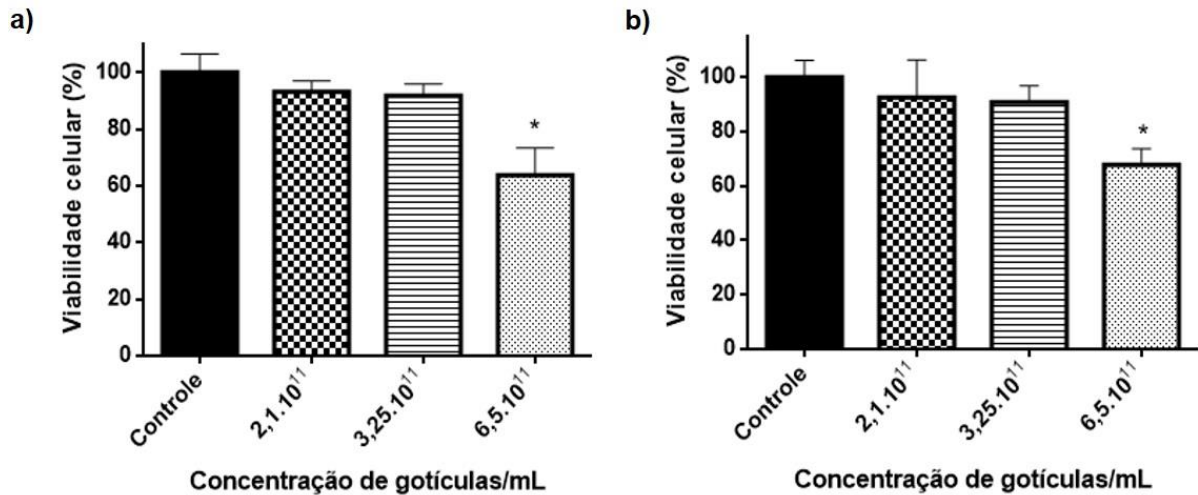
A nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe se mostrou estável quanto ao tamanho, PDI e potencial zeta durante os 60 dias de análise quando armazenadas em temperatura de 4°C (Figura 25a, 25b e 25c). Após 60 dias de armazenamento, o pH apresentou diferença significativa em comparação com a medida inicial (Figura 25d), entretanto se manteve na faixa de 6,4 a 7,2 durante todo o estudo.

### 5.3 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E FOTOTOXICIDADE *IN VITRO*

#### 5.3.1 Padronização da concentração de gotículas da nanoemulsão em contato com as células

A Figura 26 apresenta os resultados da avaliação do efeito de diferentes diluições da nanoemulsão branca sobre células de melanoma murino protegidas da luz (Figura 26a) ou irradiadas com LED de 660 nm na dose de luz de 8 J/cm<sup>2</sup> (Figura 26b).

Figura 26 – Viabilidade celular de diferentes concentrações de nanoemulsão branca sobre células de melanoma murino (n=4) mantidas protegidas da luz (a) ou irradiadas com LED de 660 nm na dose de luz de 8 J/cm<sup>2</sup> (b).



\* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) (ANOVA com pós teste de Tukey).

Quando protegidas da luz (Figura 26a), tanto a concentração de 2,1.10<sup>11</sup> quanto a concentração de 3,25.10<sup>11</sup> gotículas/mL não ocasionaram redução significativa da viabilidade celular. No entanto, a maior concentração de gotículas analisada (6,5.10<sup>11</sup>) reduziu em torno de 37% a viabilidade celular apresentando diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

O mesmo resultado foi verificado quando as diferentes diluições da nanoemulsão branca foram incubadas juntamente com as células de melanoma murino e irradiadas com LED a 660 nm com a dose de luz utilizada para os experimentos de fototoxicidade *in vitro* (8 J/cm<sup>2</sup>) (Figura 26b).

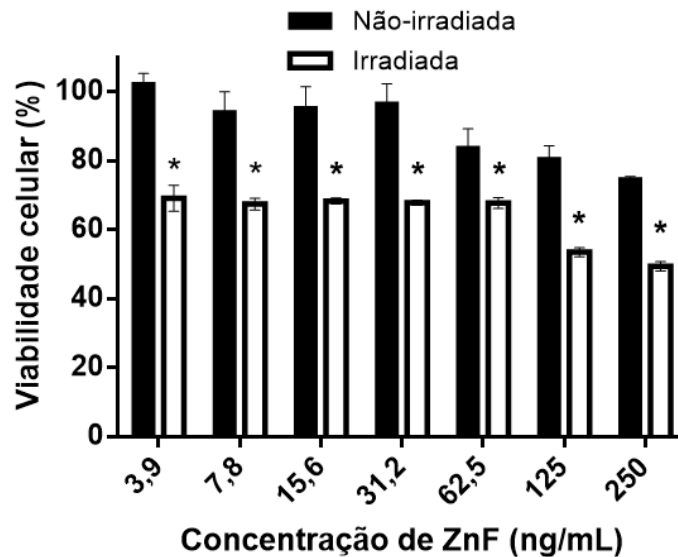
Não foi observada diferença significativa na viabilidade das células tratadas com a mesma concentração de gotículas quando irradiada ou não pelo LED (teste-t,  $p < 0,05$ ), o que permite inferir que a dose de luz utilizada não possui efeito fototóxico sobre esta linhagem celular. A partir destes resultados, a concentração de 3,25.10<sup>11</sup> gotículas/mL foi definida como a concentração de gotículas a ser utilizada e mantida constante nos experimentos de citotoxicidade e fototoxicidade da nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe.

### 5.3.2 Citotoxicidade e fototoxicidade *in vitro*

A Figura 27 mostra os resultados de viabilidade das células de melanoma tratadas com diferentes concentrações de ZnF livre, dissolvido em solução de DMSO,

irradiadas ou não com LED de 660 nm e dose de luz de 8 J/cm<sup>2</sup>. A concentração final de DMSO em contato com as células foi de 1%. O controle de DMSO nessa concentração apresentou uma viabilidade de 84,6 ± 2,8% (dados não mostrados). Essa redução apresentou diferença estatística em relação ao controle sem DMSO (teste-t, p<0,05) e por isso, para adequada avaliação do efeito somente da ZnF em causar a morte celular, sua média de absorbância foi considerada como 100% de viabilidade para o cálculo da citotoxicidade e fototoxicidade das diferentes concentrações de ZnF.

Figura 27 – Viabilidade de células de melanoma tratadas com diferentes concentrações de ZnF (n=4) quando irradiadas ou não com LED de 660 nm e dose de luz de 8 J/cm<sup>2</sup>.



\* diferença estatística (p<0,05) em relação à mesma concentração de ZnF não-irradiada (teste-t).

De acordo com os resultados obtidos é possível notar o efeito da fotoestimulação (irradiação) da ZnF na redução da viabilidade celular. Para todas as concentrações testadas houve diferença significativa entre as células tratadas com ZnF e irradiadas em relação as células tratadas, mas não irradiadas.

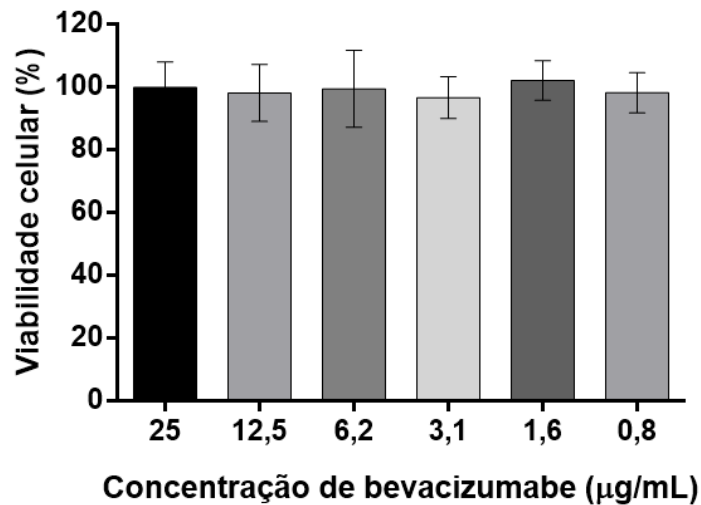
Ainda, o tratamento das células com concentrações de ZnF superiores a 31,2 ng/mL resultou numa pequena redução na viabilidade celular também na ausência da luz quando comparada às demais concentrações nas mesmas condições (ANOVA com pós teste de Tukey, p<0,05).

Não foi possível obter um valor de IC50 visto que a resposta obtida com os tratamentos não foi proporcional às concentrações avaliadas. O tratamento com 125

e 250 ng/mL de ZnF seguido de irradiação acarretou, no entanto, em morte celular significativamente maior do que o tratamento com menores concentrações (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

A Figura 28 mostra os resultados de viabilidade das células de melanoma tratadas com diferentes concentrações de bevacizumabe diluído em meio de cultura.

Figura 28 – Viabilidade de células de melanoma tratadas com diferentes concentrações de bevacizumabe (n=4).

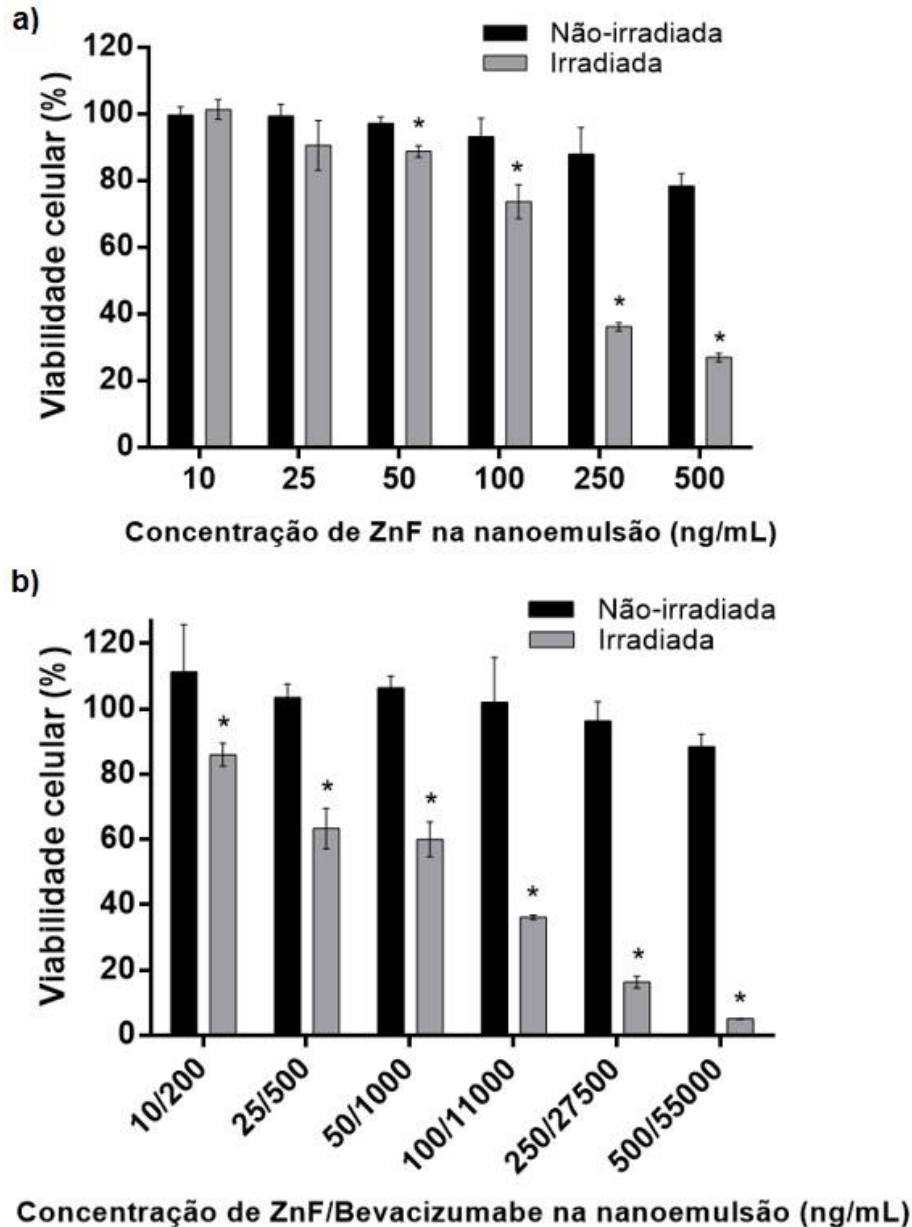


Pode-se observar na Figura 28 que nenhuma das concentrações de bevacizumabe avaliadas causou morte celular significativa em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura). Portanto, pode-se afirmar que o bevacizumabe não é citotóxico em concentrações iguais ou menores do que 25 µg/mL para células de melanoma murino cultivadas *in vitro*.

Após avaliar os efeitos dos fármacos isoladamente sobre a viabilidade das células B16F10, foram avaliados os efeitos dos fármacos incorporados à nanoemulsão. A Figura 29 apresenta os resultados do tratamento das células com uma nanoemulsão contendo somente ZnF e com uma nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe em diferentes concentrações e submetidas ou não a irradiação.



Figura 29 - Viabilidade das células de melanoma murino (B16F10) quando irradiadas ou não com LED de 660 nm na dose de luz de 8 J/cm<sup>2</sup> após tratamento com diferentes concentrações das nanoemulsões contendo: a) ZnF e b) ZnF e bevacizumabe; (n=4).



\* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação à mesma concentração de fármaco não irradiada (teste-t).

Na ausência da irradiação com luz a 660 nm, a viabilidade celular foi semelhante a observada no tratamento com a ZnF livre, não incorporada na nanoemulsão (Figura 27). Já na presença da luz, diferente do observado com o tratamento com a ZnF livre, a fototoxicidade da ZnF incorporada na nanoemulsão foi proporcional à concentração de fármaco, ou seja, a resposta foi dose-dependente (Figura 29a e 29b). As concentrações de 10, 100, 250 e 500 ng/mL

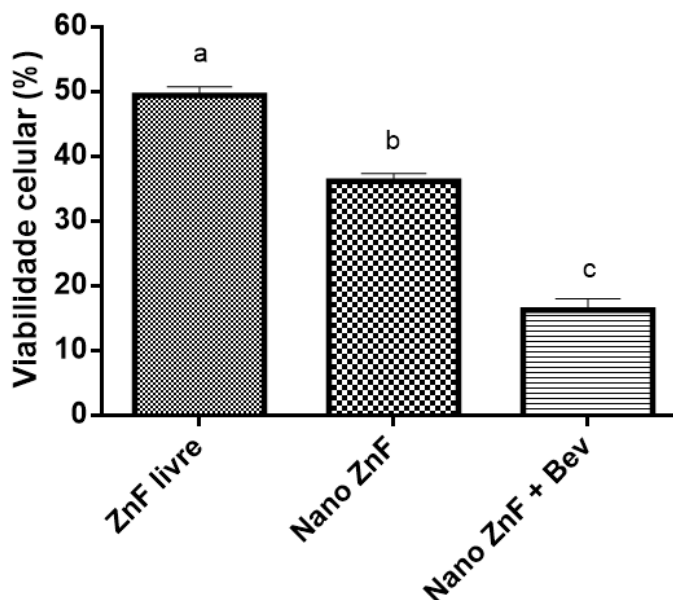
de ZnF utilizadas em ambos os tratamentos, com a nanoemulsão de ZnF ou com a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe, revelaram diferença significativa entre elas quando as células foram irradiadas (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Analisando-se a influência da irradiação para cada concentração em relação as células protegidas da luz, pode-se observar na Figura 29a que o tratamento com as concentrações mais baixas de ZnF na nanoemulsão (10 e 25 ng/mL) não resultou em toxicidade significativa em relação as células não irradiadas. Já no tratamento com a combinação de ZnF e bevacizumabe na nanoemulsão, todas as concentrações testadas mataram maiores porcentagens de células ( $p < 0,05$ , teste-t) em relação ao tratamento das células na ausência de luz tratadas com a mesma concentração dos fármacos (Figura 29b).

Os valores de IC50 obtidos para a nanoemulsão de ZnF e para a nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe quando irradiadas com o LED de 660 nm na dose de 8 J/cm<sup>2</sup> foram de  $191,7 \pm 6,3$  ng/mL e  $56,2 \pm 6,8$  ng/mL, respectivamente.

Os resultados apontam que a incorporação da ZnF na nanoemulsão potencializou seu efeito fototóxico sobre as células de melanoma murino e a associação com o bevacizumabe na nanoemulsão ocasionou uma redução na concentração média de ZnF necessária para matar 50% das células tumorais quando a luz é incidida. Esse resultado pode ser observado de forma mais clara na Figura 30 para células tratadas com 250 ng/mL de ZnF livre ou incorporada nas nanoemulsões. Neste caso, a nanoemulsão contendo ZnF apresentou uma fototoxicidade 1,5 vezes maior do que a ZnF livre, enquanto que a nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe aumentou a fototoxicidade em aproximadamente 3 e 2 vezes em relação a ZnF livre e a nanoemulsão de ZnF, respectivamente.

Figura 30 - Fototoxicidade da ZnF a 250 ng/mL em solução (livre), incorporada na nanoemulsão contendo apenas ZnF e incorporada na nanoemulsão contendo a associação de ZnF com bevacizumabe (n = 4).



Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

### 5.3.3 Avaliação da fluorescência da ZnF e do tamanho das gotículas da nanoemulsão após contato com meio de cultura

A Tabela 11 mostra o tamanho e PDI das gotículas da nanoemulsão de ZnF diluída em meio de cultura DEMEM na concentração final de 100 ng/mL, bem como agregados de ZnF diluídos da mesma forma e na mesma concentração a partir da solução de ZnF livre. Ressalta-se que a mesma diluição empregada nos experimentos de citotoxicidade e fototoxicidade foram empregadas neste experimento.

Tabela 11 – Tamanho e PDI da nanoemulsão de ZnF e agregados da solução de ZnF na mesma concentração de fármaco após diluição para 100 ng/mL de ZnF em meio de cultura DEMEM (n=3).

	Tamanho (nm)	PDI
<b>Nanoemulsão de ZnF</b>	196 ± 25	0,157 ± 0,022
<b>ZnF livre</b>	18,1 ± 0,1	0,373 ± 0,004

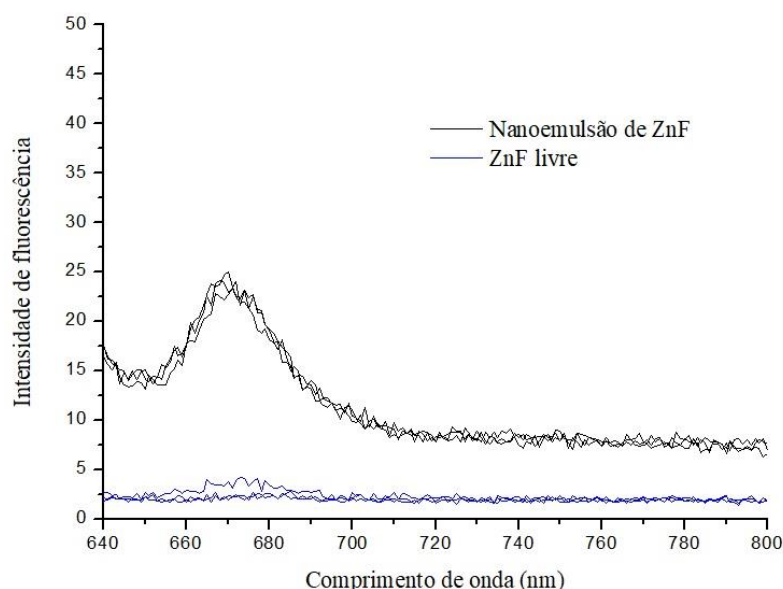
Valores expressos como média ± DP.

O tamanho das gotículas da nanoemulsão de ZnF diluída em meio de cultura foi semelhante (t-test,  $p > 0,05$ ) ao tamanho das gotículas diluídas em água (Tabela

10). Sendo assim, a nanoemulsão de ZnF se mostrou estável em meio de cultura uma vez que seu tamanho permaneceu praticamente inalterado em relação a análise em água. Já a análise da ZnF livre sugere a presença de alguns agregados com tamanho em torno de 18 nm quando a solução do fármaco em DMSO foi diluída em meio de cultura.

Os espectros de fluorescência das amostras de nanoemulsão de ZnF e de solução de ZnF diluídas em meio de cultura estão apresentados na Figura 31.

Figura 31 - Espectros de fluorescência da ZnF livre e da ZnF incorporada na nanoemulsão diluídas em meio de cultura DEMEM para concentração final de 100 ng/mL de ZnF (n=3).



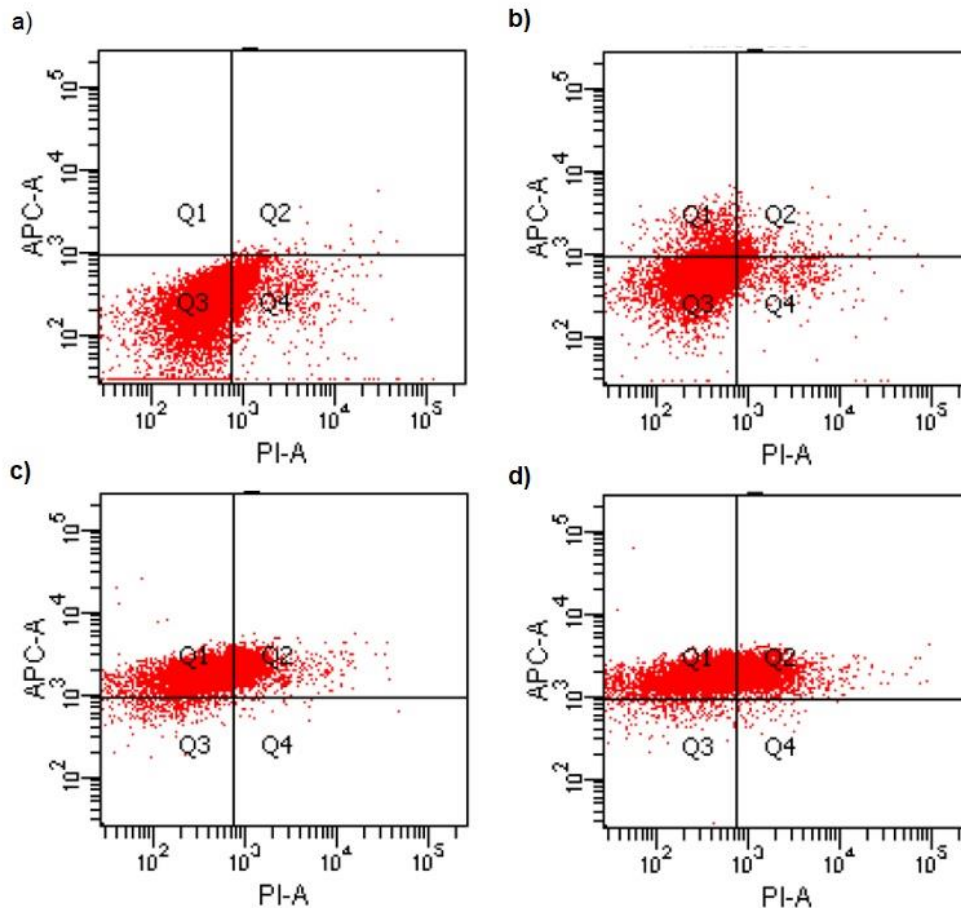
Não foi visualizado nenhum pico evidente de fluorescência no intervalo de emissão monitorado no espectro obtido pela análise da ZnF livre diluída em meio de cultura, enquanto que o espectro resultante da análise da nanoemulsão contendo ZnF diluída em meio de cultura apresentou um pico de fluorescência em 670 nm, pico este característico da emissão máxima da ZnF em DMSO (Figura 20a). A ZnF manteve, portanto, sua característica de emissão quando incorporada à nanoemulsão. O mesmo não foi verificado para a ZnF livre em solução em contato com o meio aquoso sugerindo a presença de agregados de ZnF, corroborando com a análise no DLS (Tabela 11).

#### 5.3.4 Avaliação do *uptake* celular

A Figura 32 mostra os resultados de internalização celular da ZnF obtidos por citometria de fluxo após tratamento das células de melanoma com a solução de ZnF,

a nanoemulsão de ZnF e a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe.

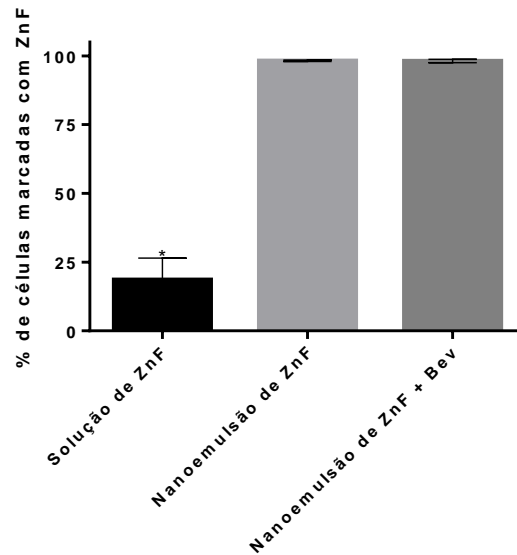
Figura 32 – Dot plots do *uptake* celular de ZnF por citometria de fluxo em células B16F10 após 4 h de tratamento com: a) controle, b) solução de ZnF (250 ng/mL), c) nanoemulsão de ZnF (250 ng/mL) e d) nanoemulsão de ZnF (250 ng/mL) e bevacizumabe. Os quadrantes Q1 e Q2 representam as células marcadas com ZnF.



Os quadrantes Q1 e Q2 apresentam as células marcadas com ZnF, sem e com marcação por IP, respectivamente. Pode-se observar na Figura 32 que quando a ZnF está incorporada à nanomulsão (Figura 32c e 32d) o *uptake* celular é de praticamente 100%, diferente do que ocorre com a ZnF em solução.

Na Figura 33 é possível visualizar os resultados em forma de porcentagem de células vivas (não marcadas por IP – quadrantes 1 e 3) que internalizaram a ZnF a partir das diferentes formulações avaliadas.

Figura 33 - Porcentagem de células vivas (não marcadas com IP) que internalizaram a ZnF na análise por citometria de fluxo.

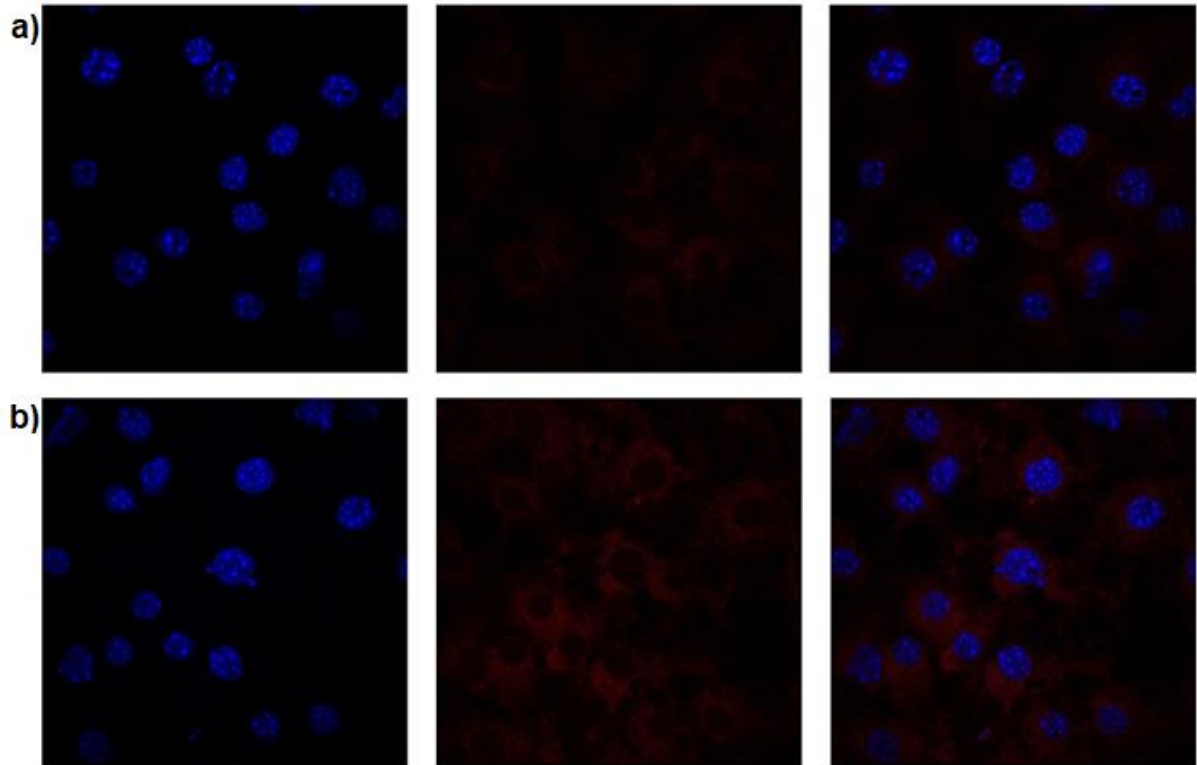


\* indica diferença estatística (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

É possível observar na Figura 33 que o tratamento das células de melanoma com a nanoemulsão contendo ZnF foi capaz de aumentar em 4 vezes o *uptake* celular de ZnF em relação à solução. Além disso, nota-se que a presença do bevacizumabe na nanoemulsão não afetou o *uptake* celular da ZnF uma vez que não houve diferença significativa entre a nanoemulsão de ZnF e a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe.

O maior *uptake* celular da ZnF pelas células de melanoma quando incorporada na nanoemulsão foi visualizado também por microscopia confocal. Na Figura 34, a fluorescência do DAPI em azul identifica o núcleo das células enquanto que a fluorescência da ZnF é visualizada em vermelho. A maior intensidade da fluorescência em vermelho da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe (Figura 34b) em comparação com a solução de ZnF (Figura 34a) confirma a maior internalização celular do fármaco. Além disso, nota-se que a ZnF internalizada se acumulou predominantemente em torno do núcleo celular, na região do citoplasma.

Figura 34 - Micrografias obtidas por microscopia confocal da internalização de ZnF (375 ng/mL) pelas células B16F10 após 4 h de tratamento com solução de ZnF (a) ou nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe (b).

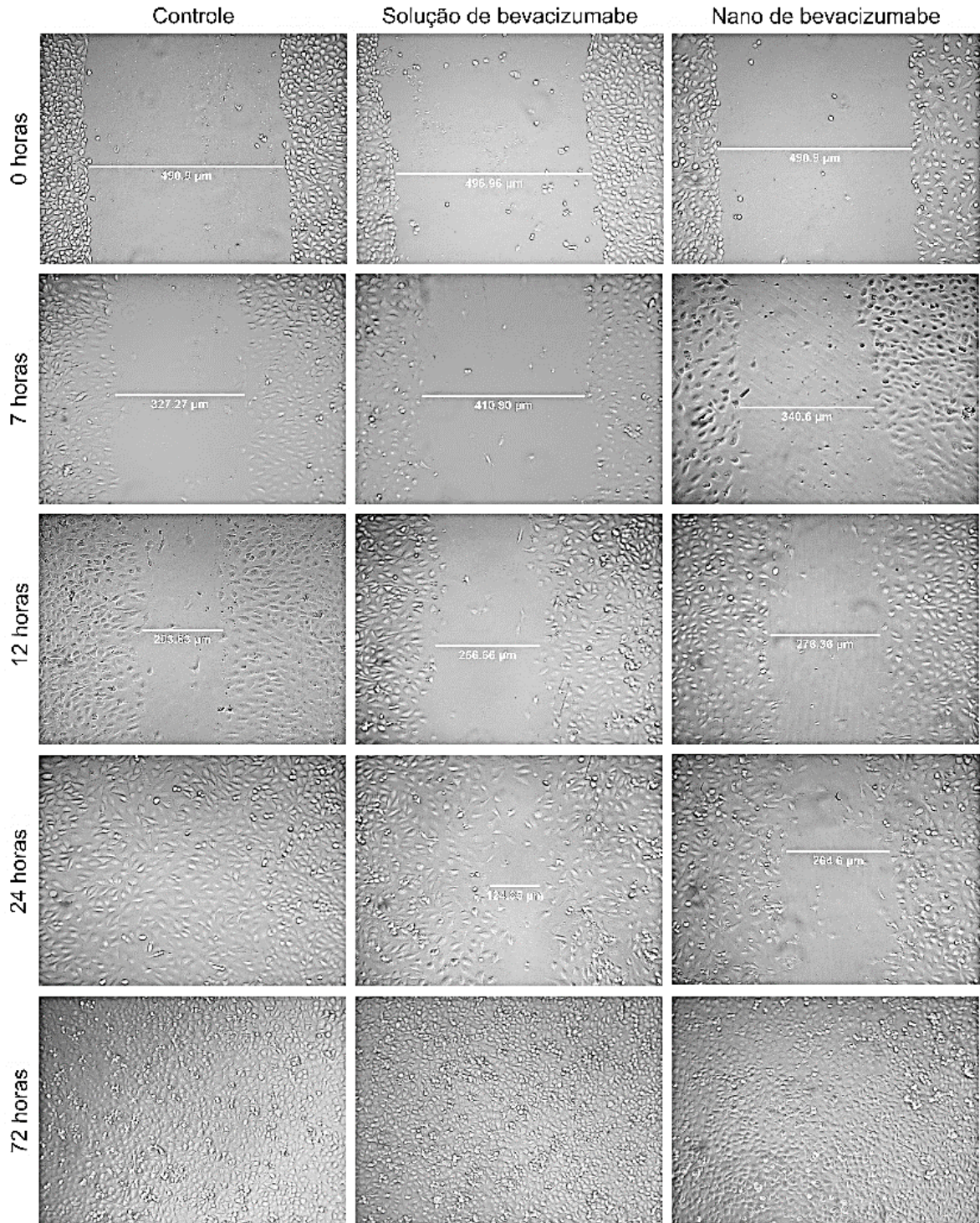


O primeiro quadrante apresenta a fluorescência referente ao DAPI, o segundo quadrante a fluorescência da ZnF e o terceiro a sobreposição das imagens dos canais azul e vermelho.

### 5.3.5 Avaliação do potencial antiangiogênico do bevacizumabe em células endoteliais

O potencial anti-angiogênico do bevacizumabe foi avaliado em função da porcentagem de fechamento do *scratch* feito na monocamada de células da linhagem endotelial CRL-2922 cultivadas em placa através de fotografias obtidas no tempo 0, 7, 12, 24 e 48 h (Figura 35).

Figura 35 – Imagens da migração de células endoteliais CRL-2922 em função do tempo, tratadas com 1 µg/mL de bevacizumabe em solução ou incorporado na nanoemulsão em relação ao controle (células não tratadas), obtidas em microscópio óptico invertido em objetiva de 10x.



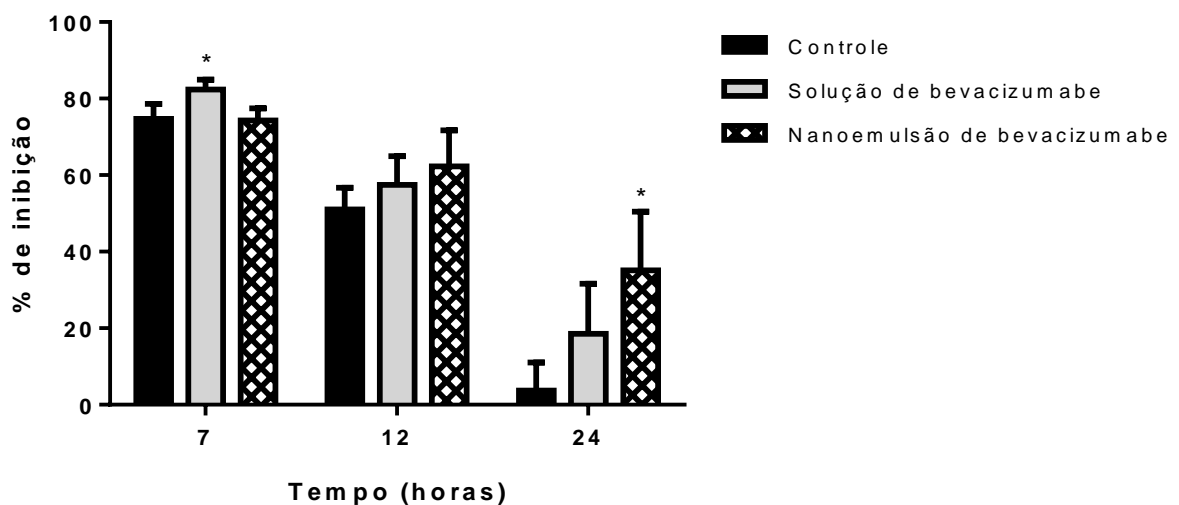
O efeito do bevacizumabe de se ligar ao VEGF e diminuir a migração celular pode ser claramente observado na Figura 35. Após 24 h da realização do “risco” na



monocamada celular, o espaço vazio entre as células nos poços controle já havia sido praticamente todo preenchido por novas células enquanto que nos poços tratadas com a solução de bevacizumabe e com a nanoemulsão de bevacizumabe o fechamento só ocorreu completamente após 48 h.

A Figura 36 mostra a porcentagem de inibição do fechamento do espaço entre as células em função do tempo.

Figura 36 – Resultados da avaliação do efeito inibitório do bevacizumabe em células endoteliais CRL-2922 em função da porcentagem de inibição da migração celular (n=4).



\* indica diferença significativa em relação ao controle no mesmo tempo de análise (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

O tratamento com a nanoemulsão de bevacizumabe inibiu significativamente (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ) a migração das células endoteliais em relação ao controle após 24 h de tratamento. O bevacizumabe livre, no entanto, foi capaz de inibir a migração celular em relação ao controle nas primeiras 7 h, mas não sustentou esta inibição em função do tempo.

#### 5.4 ENSAIOS *IN VITRO* DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA PASSIVA E IONTOFORÉTICA

A Tabela 12 mostra os resultados da estabilidade da nanoemulsão e da emulsão frente a aplicação direta da corrente elétrica de 0,5 mA por 1 h em relação ao tamanho das gotículas e a concentração de ZnF.

Tabela 12 – Estabilidade das formulações de ZnF frente a corrente elétrica constante de 0,5 mA por 1 h.

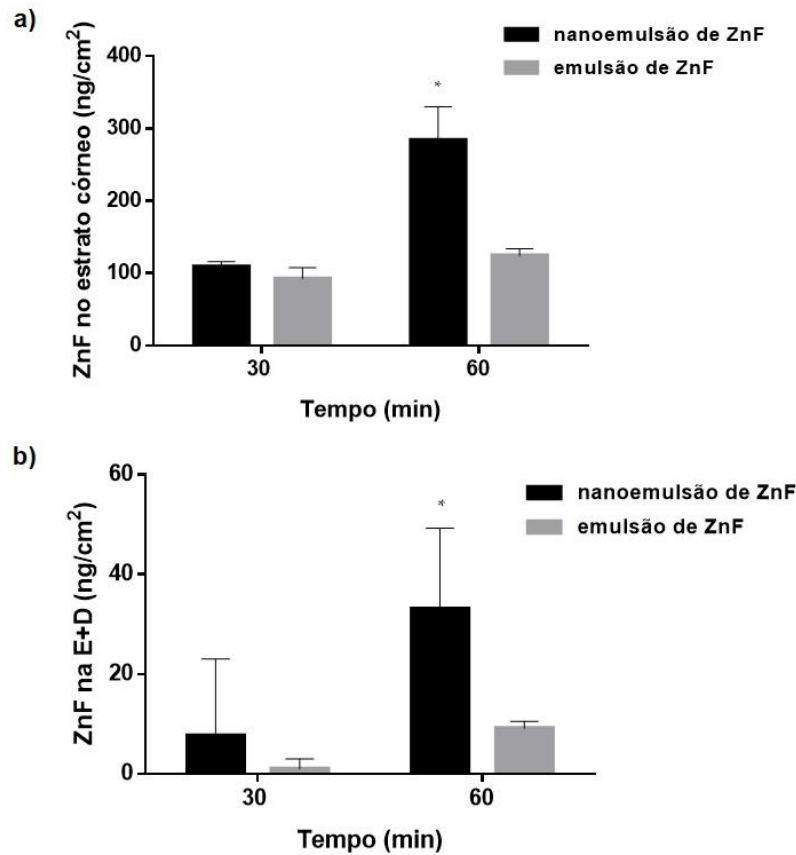
Formulações	Tamanho (nm)*		Concentração de ZnF ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Antes da corrente elétrica	Após a corrente elétrica	Antes da corrente elétrica	Após a corrente elétrica
<b>Emulsão de ZnF</b>	$14,4 \cdot 10^3 \pm 5,7 \cdot 10$	$11,7 \cdot 10^3 \pm 3,7 \cdot 10$	$4,43 \pm 0,21$	$4,43 \pm 0,15$
<b>Nanoemulsão de ZnF</b>	$166 \pm 3$	$158 \pm 5$	$4,43 \pm 0,15$	$4,40 \pm 0,17$

\* tamanho determinado por difração a laser e DLS para a emulsão e nanoemulsão, respectivamente. Valores expressos como média  $\pm$  DP de 3 determinações.

Os resultados demonstram que as formulações permaneceram estáveis após a aplicação da corrente elétrica pois não houve alterações significativas no tamanho e na concentração de ZnF (teste-t,  $p < 0,05$ ).

A Figura 37 apresenta os resultados da quantidade de ZnF extraída do estrato córneo e da E+D após 30 e 60 min de penetração passiva da emulsão e da nanoemulsão de ZnF.

Figura 37 – Penetração passiva *in vitro*: ZnF extraída do (a) estrato córneo e da (b) E+D após o tratamento passivo da pele com a nanoemulsão de ZnF (barras pretas) e a emulsão de ZnF (barras cinzas).

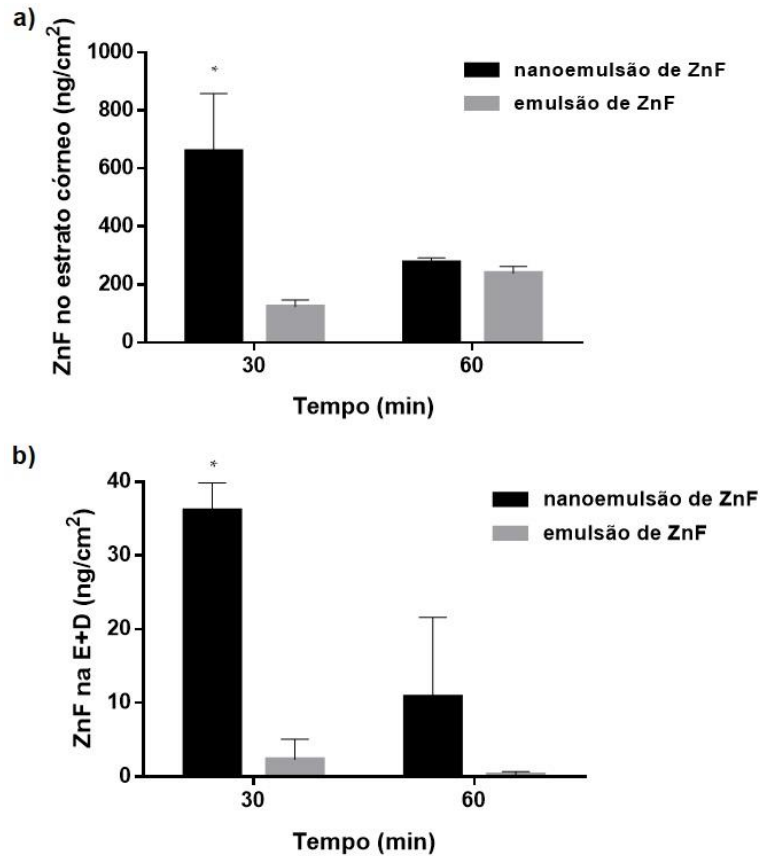


\* indica diferença estatística (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Após 30 min de contato, o tratamento passivo da pele com a emulsão ou nanoemulsão resultou em quantidades similares de ZnF nas camadas da pele. Entretanto, após 60 min o tratamento com a nanoemulsão resultou em 2,3 e 3,6 vezes mais ZnF no estrato córneo e na E+D, respectivamente, em relação ao tratamento com a emulsão.

A influência da iontoforese anódica na penetração da ZnF em função do tempo de tratamento e da formulação está apresentado na Figura 38.

Figura 38 – Iontoforese *in vitro*: ZnF extraída do (a) estrato córneo e da (b) E+D após o tratamento iontoforético da pele com a nanoemulsão de ZnF (barras pretas) e a emulsão de ZnF (barras cinzas).



\* indica diferença estatística (ANOVA com pós teste de Tukey, p<0,05).

A iontoforese da nanoemulsão resultou num aumento de aproximadamente 5 vezes na quantidade de ZnF no estrato córneo em relação ao tratamento com a emulsão, nos primeiros 30 min (Figura 38a). Este aumento foi ainda mais significativo na E+D (Figura 38b), na qual quase 16 vezes mais ZnF foi extraída após os 30 min de iontoforese com a nanoemulsão do que com a emulsão.

A quantidade de ZnF que penetrou no estrato córneo a partir do tratamento de iontoforese com a emulsão aumentou em função do tempo de aplicação da iontoforese (Figura 38a, barras cinzas, teste-t, p<0,05). Porém, esse aumento não se refletiu na E+D na qual a quantidade de ZnF extraída não demonstrou diferença significativa entre os dois diferentes tempos de aplicação da iontoforese (Figura 38b, barras cinzas). Por outro lado, a aplicação da iontoforese na nanoemulsão por 60 min resultou em uma diminuição na quantidade de ZnF tanto no estrato córneo (Figura 38a, barras pretas) como na E+D (Figura 38b, barras pretas) em relação a aplicação

por 30 min. Não foi possível quantificar a ZnF no meio receptor pois a concentração estava abaixo do limite de quantificação do método.

Na Tabela 13 estão descritos os quocientes da razão entre a penetração iontoforética e passiva da ZnF para cada formulação e em cada tempo de tratamento.

Tabela 13 – Razão entre a quantidade de ZnF após a penetração iontoforética e a quantidade de ZnF após a penetração passiva.

Formulação	Penetração iontoforética de ZnF / penetração passiva de ZnF			
	Estrato córneo		E+D	
	30 min	60 min	30 min	60 min
<b>Emulsão</b>	1,3	1,9	2,3	0,03
<b>Nanoemulsão</b>	6	0,9	4,7	0,33

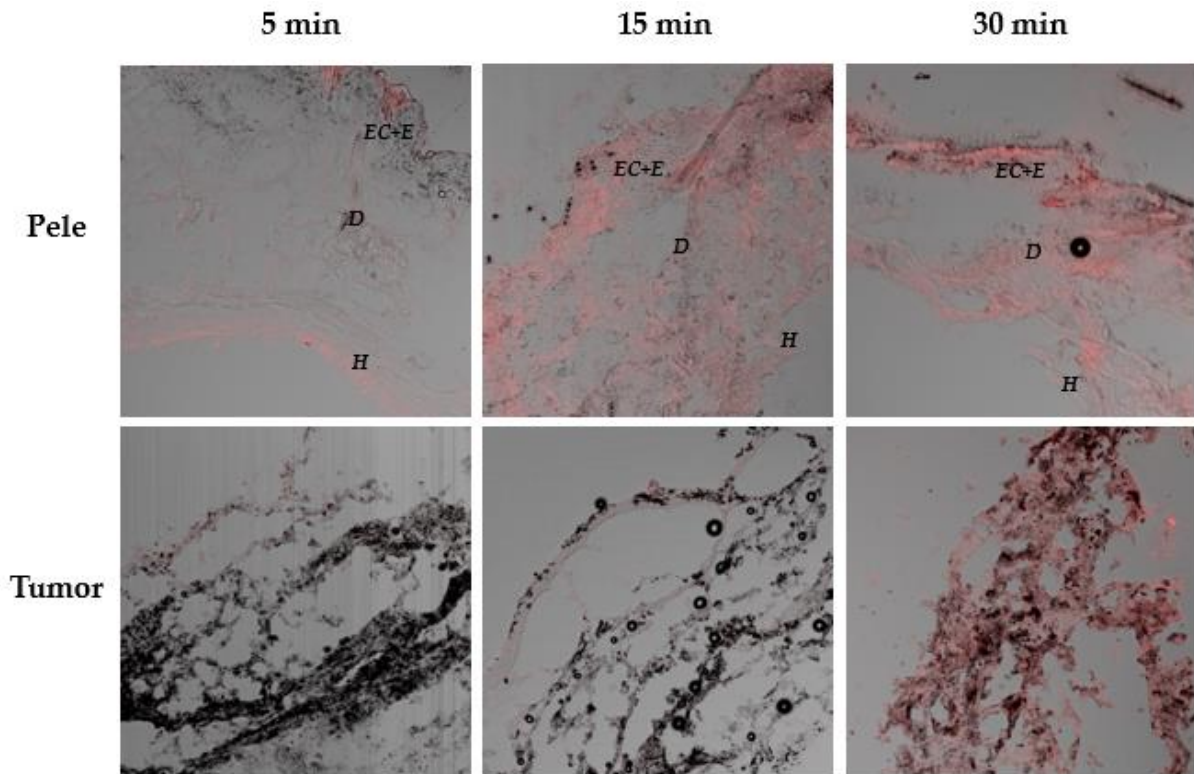
Em comparação com a penetração passiva, a iontoforese claramente aumentou a penetração de ZnF após 30 min de tratamento, independentemente da formulação (emulsão ou nanoemulsão), mas principalmente para a nanoemulsão (6 vezes no estrato córneo e aproximadamente 5 vezes na E+D – Tabela 13). Entretanto, após 60 min a iontoforese pareceu não influenciar ou mesmo diminuir a quantidade de ZnF na pele em relação ao tratamento passivo, especialmente para a nanoemulsão. Como a aplicação da corrente elétrica demonstrou não degradar a ZnF (Tabela 12), essa diminuição da quantidade de fármaco no estrato córneo e na E+D quando a iontoforese é aplicada por um tempo maior (60 min) pode estar relacionada com a maior permeação do fármaco através da pele chegando no meio receptor. Entretanto, a sensibilidade do método analítico não foi suficiente para detectar esta permeação no meio receptor do estudo de penetração *in vitro*.

## 5.5 ESTUDOS *IN VIVO*

### 5.5.1 Definição do tempo de aplicação da iontoforese e avaliação da distribuição da ZnF no tumor

A Figura 39 apresenta a fluorescência característica da ZnF em vermelho detectada nas amostras de pele e do tumor após 5, 15 e 30 min do tratamento com a nanoemulsão de ZnF sob aplicação da iontoforese (0,5 mA/cm<sup>2</sup>) no tumor induzido nos animais.

Figura 39 – Imagens das criosecções de 20  $\mu\text{m}$  de espessura perpendiculares a superfície da pele e do tumor obtidas em microscópio confocal representativas do resultado de penetração *in vivo* após diferentes tempos de aplicação da iontoforese na nanoemulsão de ZnF (EC + E: estrato córneo e epiderme, D: derme, H: hipoderme). As imagens representam a sobreposição do campo claro e do campo escuro. A fluorescência da ZnF foi observada no canal vermelho em aumento de 20 vezes ( $\lambda_{\text{exc}} = 638 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}} = 640\text{-}700 \text{ nm}$ ).



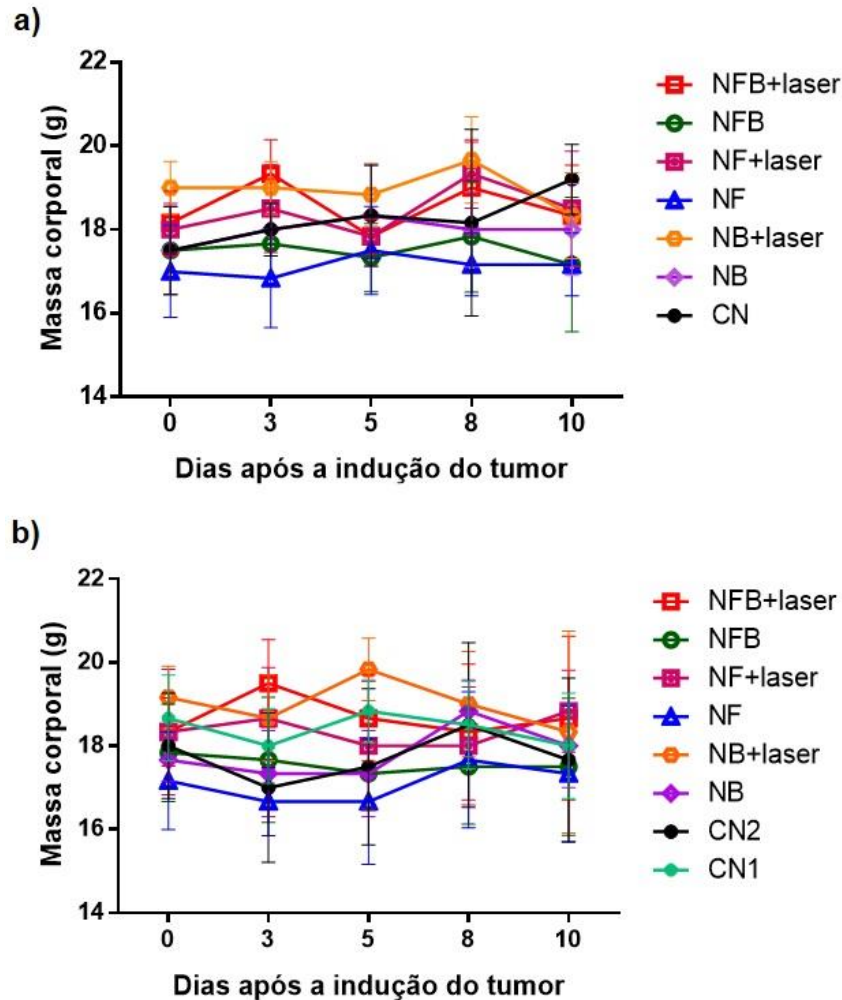
A fluorescência da ZnF pode ser observada na pele que recobria o tumor até mesmo com a aplicação de somente 5 min de iontoforese. Entretanto, para ser possível a visualização de ZnF no tumor foi necessário 30 min de aplicação da iontoforese. Este tempo de aplicação foi suficiente para que a ZnF se distribuisse homogeneamente no tumor. Em função deste resultado o tempo de aplicação definido para o experimento da avaliação do efeito da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe no tratamento tópico com iontoforese do melanoma induzido em camundongos foi de 30 min.

### 5.5.2 Avaliação do efeito da administração intratumoral e da iontoforese da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe na TFD do melanoma induzido em camundongos

A massa corporal dos animais foi monitorada durante todo o estudo. Os valores

obtidos em cada dia analisado estão apresentados na Figura 40.

Figura 40 – Massa corporal dos camundongos durante o estudo *in vivo* (n=5) em função do tempo: a) tratamento intratumoral b) tratamento tópico com iontoforese.



\*significa diferença estatística em relação ao grupo CN1 no mesmo tempo (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

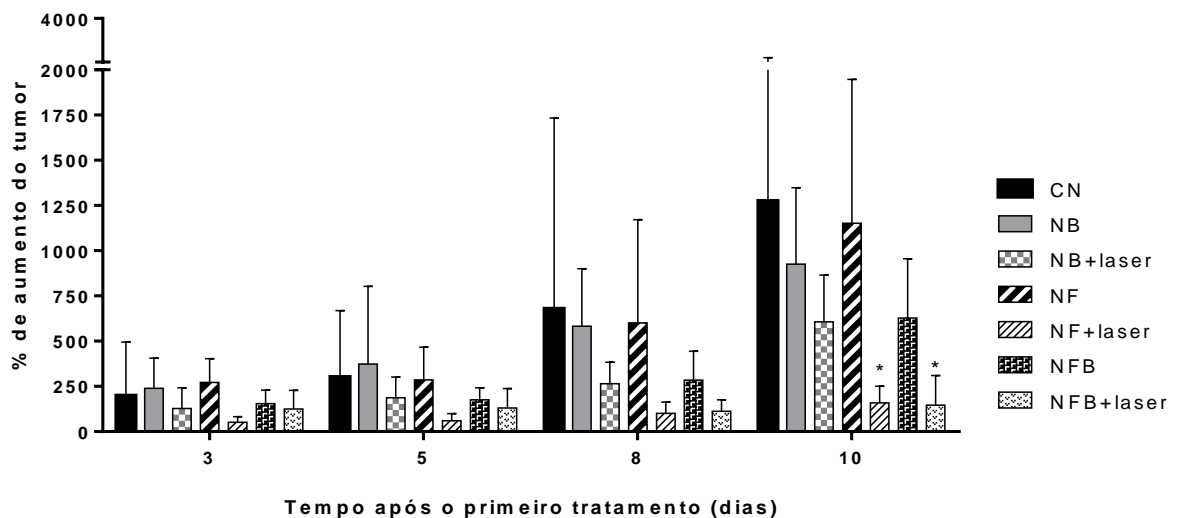
Não foram observadas diferenças significativas em relação a massa corporal com o passar dos dias após a indução do tumor em nenhum dos grupos avaliados (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Apenas dois animais morreram antes do término dos experimentos: um do grupo controle negativo do tratamento pela via intratumoral (CN) e outro do grupo que foi tratado topicamente com a nanoemulsão branca (NB). Os mesmos apresentaram movimentação lenta e estavam visivelmente fracos no 8º dia após o início do tratamento, vindo a morrer no 9º dia.

A Figura 41 mostra a porcentagem de aumento do tumor em função do tempo

após os diferentes protocolos de tratamento por via intratumoral dos animais que sobreviveram.

Figura 41 - Porcentagem de aumento do melanoma induzido em camundongos C57BL6 em função do tempo após injeção intratumoral das formulações (tampão fosfato - CN, nanoemulsão branca - NB, nanoemulsão de ZnF - NF e nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe - NFB) seguida ou não da irradiação com laser a 670 nm com dose de 100 J/cm<sup>2</sup> (n=5).



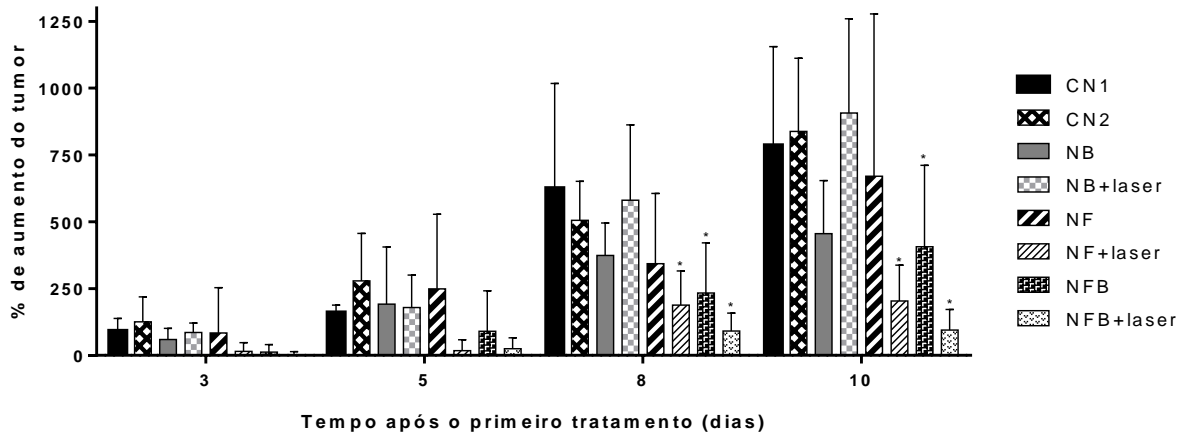
\*significa diferença estatística em relação ao grupo CN no mesmo tempo (Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

Após 10 dias da injeção intratumoral das formulações seguida ou não da irradiação com luz, os animais do grupo controle (CN) apresentaram um aumento médio da massa tumoral de 1272% em relação ao dia em que o tratamento foi iniciado, enquanto que os grupos tratados com a nanoemulsão de ZnF (NF) e com a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe (NFB) seguida da irradiação com laser apresentaram aumentos na faixa de 159 e 147 %, respectivamente. Desta forma, os tratamentos com a NFB e com a NF seguida da TFD demonstraram ter efeito positivo sobre a redução do crescimento do tumor, pois a análise estatística revelou diferença significativa entre estes grupos em comparação com o controle (Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

A Figura 42 mostra a porcentagem de aumento do tumor em função do tempo após os diferentes protocolos de tratamento por iontoforese.



Figura 42 - Porcentagem de aumento do melanoma induzido em camundongos C57BL6 em função do tempo após tratamento tópico com aplicação da iontoforese (0,5 mA/cm<sup>2</sup> durante 30 min) das formulações (tampão fosfato sem iontoforese – CN1, tampão fosfato com iontoforese (CN2), iontoforese da nanoemulsão branca – NB, da nanoemulsão de ZnF – NF e da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe – NFB) seguida ou não da irradiação com laser a 670 nm com dose de 100 J/cm<sup>2</sup> (n=5).



\*significa diferença estatística em relação ao grupo CN1 no mesmo tempo (Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

Os controles de PBS (CN1) e PBS com a aplicação da iontoforese (CN2) não apresentaram diferença entre eles em nenhum dos tempos avaliados (teste-t,  $p < 0,05$ ), portanto todas as comparações foram realizadas em relação ao controle de PBS.

Na administração tópica com a aplicação da iontoforese, após 8 dias do início do tratamento os grupos tratados com a nanoemulsão de ZnF irradiada (NF+laser) e com a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe (NFB) irradiada ou não com laser apresentaram uma redução significativa da porcentagem de aumento do tumor em relação ao grupo controle, sendo que do dia 8 para o dia 10 praticamente não houve crescimento do tumor nos grupos tratados com a NF e com a NFB irradiados com o laser, já que a porcentagem de aumento se manteve praticamente igual.

Ao final dos 10 dias de experimento, a taxa de crescimento do melanoma tratado com a iontoforese da NF e da NFB seguido da TFD (irradiados com laser) reduziu significativamente 3,8 ( $203,5 \pm 134,1\%$ ) e 8,3 ( $94,8 \pm 77,1\%$ ) vezes respectivamente em relação ao controle ( $785,5 \pm 369,8\%$ ) (Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). A influência do bevacizumabe sobre a redução do crescimento tumoral também pode ser observado após tratamento com a NFB sem irradiação de luz, que reduziu o crescimento tumoral em 2 vezes em relação ao CN

(Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

Para melhor comparação da resposta obtida pelas diferentes vias de administração utilizadas, a Tabela 14 mostra a porcentagem de aumento do tumor em relação ao volume inicial após os 10 dias da injeção intratumoral ou da iontoforese da nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe (NFB), irradiada ou não, e da nanoemulsão de ZnF (NF) irradiada.

Tabela 14 - Porcentagem de aumento do tumor em relação ao controle após 10 dias do tratamento com injeção intratumoral ou iontoforese da nanoemulsão de ZnF (NF) irradiada com laser (670 nm, 100 J/cm<sup>2</sup>) e das nanoemulsões adicionadas também de bevacizumabe (NFB), irradiadas ou não.

Tratamento	Via de administração	
	Injeção Intratumoral	Iontoforese
<b>NF + laser</b>	159,2 ± 92,1	203,5 ± 134,1
<b>NFB + laser</b>	146,7 ± 163,8	94,9 ± 77,1
<b>NFB sem laser</b>	628,3 ± 327,4	406,9 ± 304

Média ± desvio padrão de 5 animais.

Comparando-se os resultados em função das duas diferentes vias de administração, nota-se que, apesar da análise estatística não revelar diferença significativa devido ao alto desvio padrão das amostras (teste-t,  $p < 0,05$ ), os grupos tratados com a iontoforese apresentaram menores porcentagens de aumento de tamanho do tumor após 10 dias do início do tratamento tanto para o grupo tratado com NFB sem irradiação quanto para o grupo tratado com NFB seguida da aplicação do laser, nos permitindo supor que a aplicação tópica com iontoforese foi tão ou mais eficiente que a administração intratumoral em conter o aumento do tumor.

Após os tumores serem retirados dos animais eles foram pesados em balança semi-analítica (Tabela 15). Os resultados da análise da massa tumoral não revelaram diferença significativa entre nenhum dos grupos, independente da via de administração (ANOVA, com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

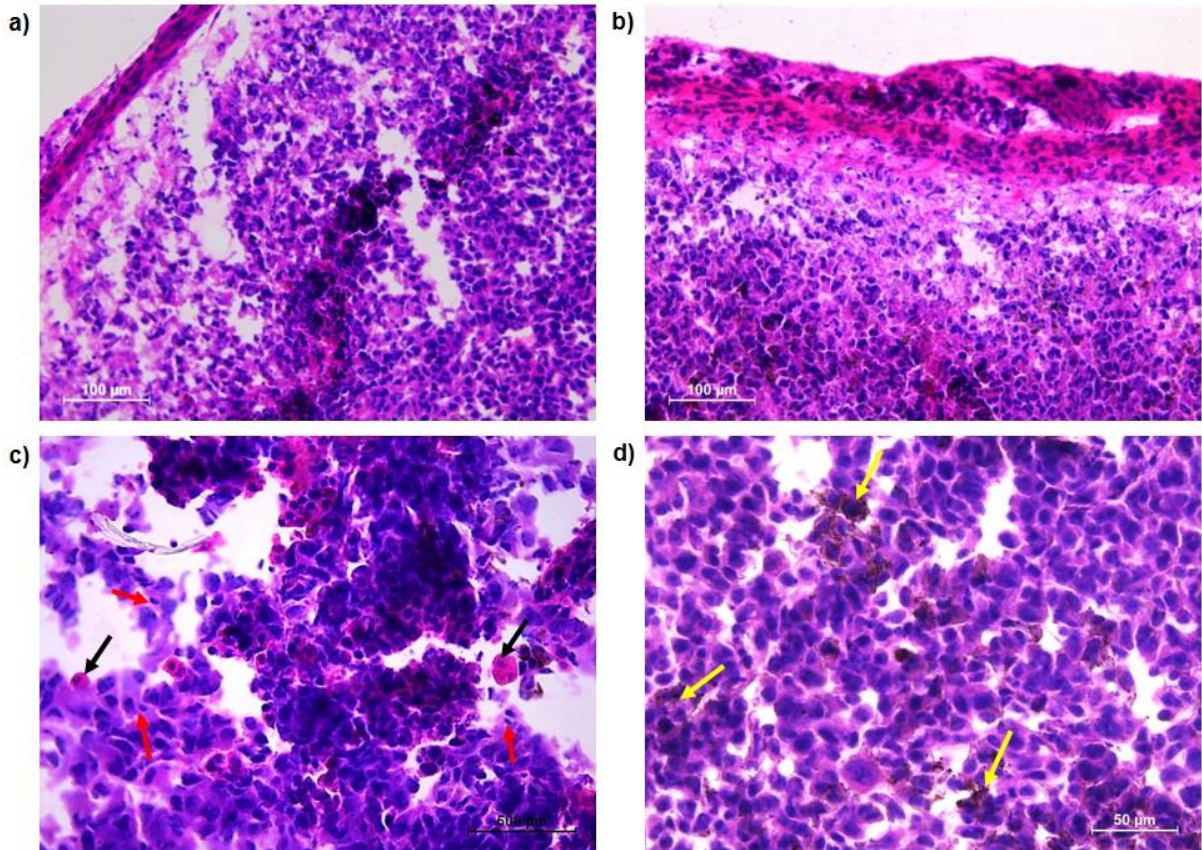
Tabela 15 – Resultados do tratamento em função da massa do tumor.

<b>Grupos</b>	<b>Massa do tumor (g)</b>	
	<b>Tratamento intratumoral</b>	<b>Tratamento tópico com iontoforese</b>
<b>CN ou CN1</b>	0,61 ± 0,68	0,52 ± 0,32
<b>CN2</b>	-	0,47 ± 0,28
<b>NB</b>	0,67 ± 0,37	0,23 ± 0,05
<b>NB+laser</b>	0,39 ± 0,15	0,65 ± 0,32
<b>NF</b>	0,66 ± 0,45	0,33 ± 0,24
<b>NF+laser</b>	0,14 ± 0,09	0,58 ± 0,26
<b>NFB</b>	0,41 ± 0,21	0,57 ± 0,48
<b>NFB+laser</b>	0,21 ± 0,14	0,29 ± 0,17

Valores expressos como média ± DP \*significa diferença estatística (ANOVA com pós teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

A característica morfológica geral do tecido tumoral após os diferentes tratamentos pode ser observada nas micrografias representativas dos cortes histológicos dos tumores corados com hematoxilina e eosina apresentadas na Figura 43.

Figura 43 – Micrografias representativas de cortes histológicos dos tumores retirados dos camundongos após os diferentes tratamentos corados com hematoxilina e eosina e obtidas com aumento de 20x (a e b) e 40x (c e d). As setas vermelhas apontam células com núcleo picnótico; as setas pretas apontam células do sistema imune (macrófagos e linfócitos); as setas amarelas apontam áreas de melanina abundante (pigmentação marrom escuro).



Do ponto de vista microscópico os tumores removidos, independente do tratamento, apresentaram-se como um tecido de alta celularidade com núcleos disformes e de tamanhos variados. Núcleos picnóticos cuja cromatina é extremamente condensada, reduzindo seu tamanho, puderam ser observados (setas vermelhas na Figura 43c) e indicam células em processo de apoptose. Além disso, é notada a presença de células do sistema imunológico, como macrófagos e linfócitos (Figura 43c, setas pretas).

A presença da melanina, pigmento característico da pele e do melanoma, foi observada em todas as lâminas. As setas em amarelo na Figura 43d apontam áreas de melanina abundante (coloração marrom escuro).

Além dos tumores, outros órgãos que visivelmente aparentaram suspeita de metástase foram retirados para avaliação histológica por coloração com hematoxilina

e eosina. Foram retirados dos animais os seguintes órgãos: baço, fígado e estômago. O aspecto macroscópico destes órgãos revelou uma cor escura, diferente da cor normal do tecido, além de que, em alguns casos, o órgão estava visivelmente com tamanho aumentado. Fotografias destas observações foram obtidas durante o experimento e estão demonstradas na Figura 44.

Figura 44 – Fotografias dos órgãos com suspeita de metástase retirados dos camundongos após tratamento por injeção intratumoral. a) estômago, b) baço, c) fígado.

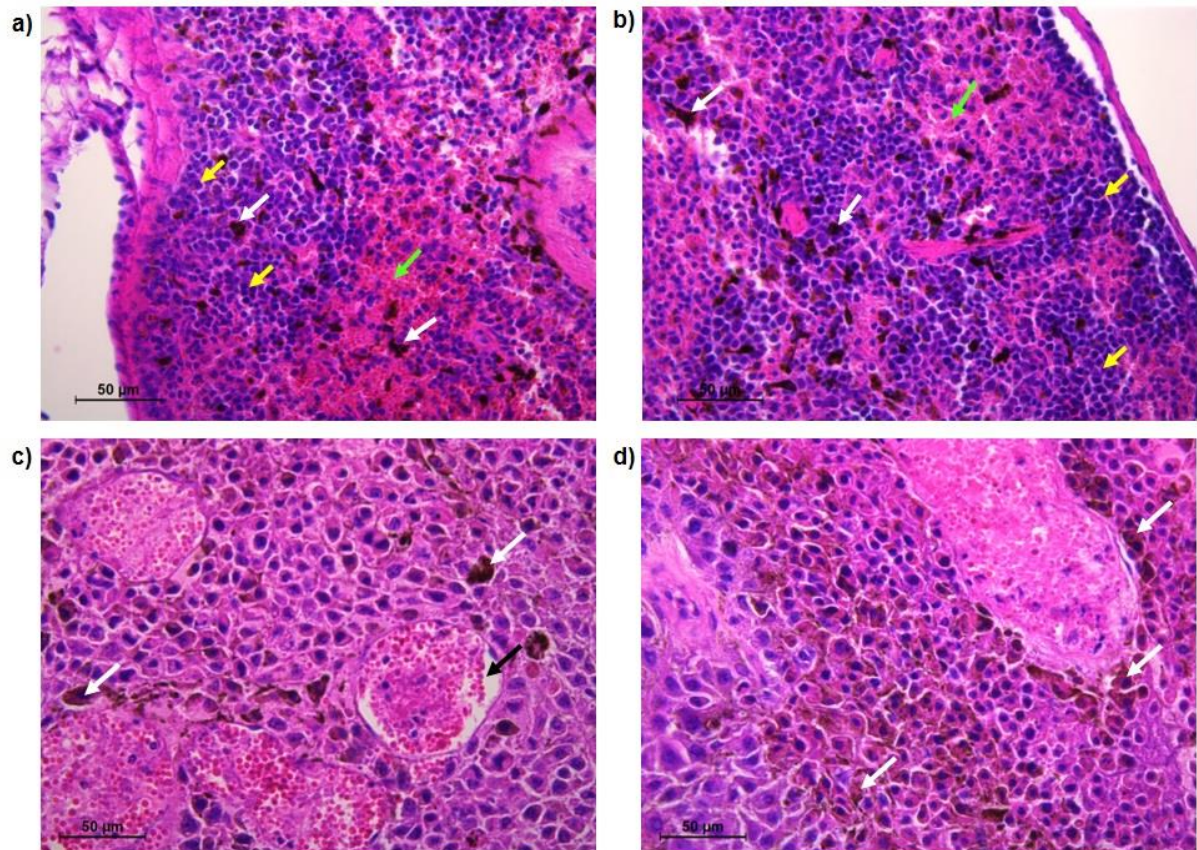


Curiosamente, apesar do aspecto visual escuro, todos os estômagos avaliados não revelaram a presença de metástase. Por outro lado, em todos os baços e fígados retirados foi observado a presença de células com citoplasma acastanhado - melanocíticas, indicando a presença de metástase.

No tratamento por via intratumoral, apenas os grupos que receberam a nanoemulsão branca (NB) e a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe (NFB), ambos seguidos da aplicação do laser é que não foram observadas metástases em nenhum dos animais. Já no tratamento por via tópica com iontoforese o único grupo em que nenhum animal apresentou metástase foi o grupo tratado com a NFB seguido da irradiação com o laser.

As micrografias representativas dos órgãos com metástase, fígado e baço, estão apresentadas na Figura 45.

Figura 45 – Micrografias representativas de cortes histológicos dos órgãos retirados dos camundongos com metástase do melanoma corados com hematoxilina e eosina e obtidos com aumento de 40x. a,b) baço; c,d) fígado. As setas amarelas apontam a polpa branca do baço; as setas verdes apontam a polpa vermelha do baço; a seta preta aponta uma veia centro lobular do fígado e as setas brancas apontam células metastáticas melanocíticas.

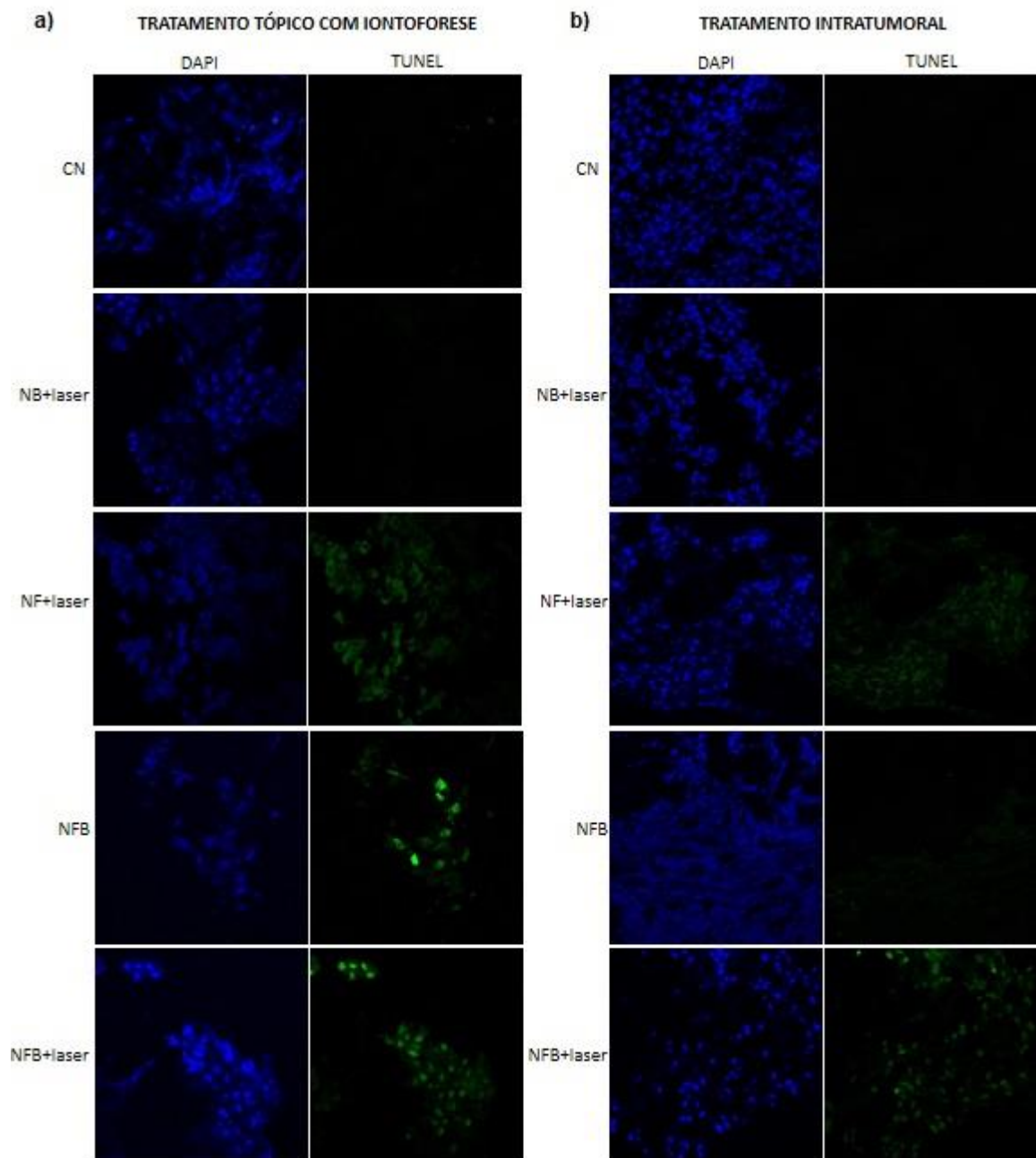


Na Figura 45a e b estão representadas duas micrografias de baço nas quais se observa a presença característica da polpa branca e da polpa vermelha características deste órgão, indicadas pelas setas amarelas e verdes, respectivamente. A maior proporção da polpa branca em relação a vermelha, que pode ser observada em ambos os cortes histológicos, evidencia a grande proliferação de leucócitos no tecido, provavelmente em resposta a invasão de células tumorais. A presença de metástase do melanoma é notada pelas manchas marrom escuras localizadas em toda extensão do tecido.

De maneira semelhante, as micrografias do fígado (Figura 45c e d) apresentam células diferenciadas com citoplasma de coloração castanho/marrom provenientes do melanoma.

A Figura 46 mostra micrografias representativas obtidas por microscopia confocal de varredura a laser para visualização do resultado da marcação de células apoptóticas nos cortes histológicos dos tumores pelo ensaio do TUNEL.

Figura 46 – Micrografias obtidas por microscopia confocal de cortes histológicos representativos do tumor após os tratamentos com marcação de células apoptóticas pelo ensaio do TUNEL nos aumentos de 63 (a) e 40 vezes (b).



Comparando-se os resultados obtidos para cada grupo de acordo com o tratamento realizado é possível notar que os cortes histológicos nos quais um maior

número de núcleos das células tumorais foi marcado com fluorescência verde específica do kit TUNEL foram aquelas correspondentes aos grupos tratados com a nanoemulsão de ZnF e irradiadas com o laser ou com a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe e irradiadas com o laser. No grupo que recebeu a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe sem a aplicação do laser foram observados núcleos apoptóticos somente quando esta formulação foi administrada por via tópica com iontoforese.



## 6 DISCUSSÃO

O tratamento do melanoma, apesar de todos os avanços terapêuticos, ainda é um grande desafio. A terapia alvo e a imunoterapia demonstraram grandes avanços clínicos porém, o mecanismo de resistência das células tumorais aos fármacos e os efeitos adversos graves e potencialmente letais em decorrência do tratamento sistêmico são obstáculos a serem vencidos, já que o tempo de sobrevivência de pacientes com melanoma metastático permanece crítico. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nanoemulsão de aplicação tópica contendo um anticorpo anti VEGF (bevacizumabe) e um fármaco FS utilizado na TFD (ZnF) para o tratamento do melanoma cutâneo visando a morte das células tumorais em virtude da ZnF-TFD e a inibição do rápido processo de crescimento e metástase do tumor em virtude da imunoterapia com o bevacizumabe. A iontoforese foi associada à formulação para investigar a possibilidade do tratamento tópico do melanoma.

O desenvolvimento de uma nanoemulsão O/A foi proposto para melhorar as características de solubilidade da ZnF em meio biológico e sua eficácia na TFD. Além disso, este tipo de nanocarreador foi escolhido por permitir a incorporação do bevacizumabe na mesma formulação, uma vez que nanoemulsões são sistemas dispersos constituídos de duas fases com características distintas de solubilidade entre elas tornando-as, portanto, capazes de incorporar concomitantemente fármacos com características lipofílicas e hidrofílicas.

Os componentes da formulação foram escolhidos visando a solubilização de quantidades adequadas de ZnF, o tamanho nanométrico das gotículas e baixo PDI. O principal constituinte da fase oleosa foi o TCM, mistura de três ácidos graxos de cadeia média (6-12 átomos de carbono), como o ácido cáprico (C10) e o caprílico (C8), esterificados ao glicerol. O TCM foi escolhido por possuir característica de solubilidade em água cerca de 100 vezes maior do que os triglicerídeos de cadeia longa presentes nos óleos naturais (BRUXEL et al., 2012) o que tende a facilitar a formação das nanoemulsões do tipo O/A. No entanto, ele apresenta características lipofílicas o suficiente para dissolver fármacos lipofílicos (FRONZA; CAMPOS; TEIXEIRA, 2004), como é o caso da ZnF, cujo logaritmo do coeficiente de partição óleo/água ( $\log P$ ) é maior do que 8 (LOVE; VAN DER ZANDEN; TAYLOR, 1997). O DOTAP, lipídeo catiônico, foi adicionado com a finalidade de conferir carga positiva às gotículas da nanoemulsão. Sabe-se que dispersões com alto potencial zeta têm sua estabilidade

aumentada devido à repulsão entre as partículas que impedem sua agregação (HONARY; ZAHIR, 2013). Além disso, o potencial zeta positivo das dispersões pode contribuir para uma melhor interação das formulações com a pele e para uma maior eficiência da iontoforese anódica. Isso porque, devido ao baixo pKa dos grupos carboxilato dos ácidos graxos que compõem o estrato córneo (BLANK, 1939), a pele apresenta carga residual negativa quando em contato com formulações em pH acima de 4,5 (BURNETTE; ONGPIPATTANAKUL, 1987) como as desenvolvidas neste trabalho. Desta forma, as partículas catiônicas interagem melhor com a pele do que as partículas aniônicas (BASPINAR; BORCHERT, 2012; WU et al., 2010). Ainda, sob aplicação da iontoforese, a carga negativa do estrato córneo favorece o fluxo eletrosmótico do ânodo para o cátodo (GUY et al., 2000) e o potencial zeta positivo das dispersões deve favorecer a eletromigração (HUBER et al., 2015), contribuindo para o transporte elétrico do fármaco através da pele por iontoforese anódica.

Os tensoativos utilizados para contribuir no processo de nanoemulsificação do TCM em meio aquoso foram o polissorbato 80 e o poloxamer 188 (Tabela 2), ambos classificados como tensoativos não-iônicos. O poloxamer é um copolímero tribloco formado por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno (PEO) e uma hidrofóbica central de polioxipropileno (PPO) com valor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo alto (EHL~29) (FRIEDRICH et al., 2008). Já o polissorbato 80 é um tensoativo com EHL intermediário (EHL=15) e baixa massa molecular (MM=1,3kDa), capaz de formar monocamadas ao redor de gotículas oleosas com baixas tensões interfaciais, o que favorece a turbulência interfacial e a formação de gotículas nanométricas (CHANG; MCCLEMENTS, 2014; GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013). Os tensoativos não-iônicos são, de fato, a classe de tensoativos preferida para a aplicação tópica por não causar irritação na pele (PAWAR; BABU, 2014), possuir maior grau de compatibilidade com diversas substâncias e ser menos sensível às alterações de pH ou à adição de eletrólitos (BILLANY, 2005). A presença de grupos de óxido de etileno e longas cadeias de hidrocarbonetos faz com que estes tensoativos sejam capazes de promover forte estabilização estérica de nanoemulsões (HOELLER; SPERGER; VALENTA, 2009).

A lecitina de ovo (Lipoid E80) foi adicionada para atuar como cotensoativo de natureza anfifílica (PARK et al., 1999). As lecitinas possuem alta afinidade pelas membranas celulares e apresentam ação promotora de permeação cutânea pela interação com os lipídeos do estrato córneo (PAWAR; BABU, 2014). A de ovo, em

particular, possui uma elevada lipofilicidade, pois é constituída por uma mistura complexa de fosfolipídios extraídos da gema do ovo, sendo a fosfatidilcolina a mais abundante (80%) (PARK et al., 1999). Além disso, apresenta característica neutra em uma ampla faixa de pH (TIWARI; SHENOY; AMIJI, 2006) e tem sido muito empregada em combinação com tensoativos não iônicos, como o polissorbato 80 e o poloxamer 188, no preparo de nanoemulsões (FRONZA; CAMPOS; TEIXEIRA, 2004; HAGIGIT et al., 2008; RAGELLE et al., 2012).

A formação de nanoemulsões depende, além da combinação e concentração adequada de tensoativos, da utilização de processos de emulsificação com alta energia de agitação. Um destes processos de alta energia utilizados para formação de nanoemulsões é a ultrassonicação. A emulsificação ultrassônica é uma técnica que tem sido bastante empregada devido à sua alta eficiência em reduzir o tamanho das gotículas quando comparada à homogeneização a alta pressão ou a microfluidização (MAHDI JAFARI; HE; BHANDARI, 2006; MEDINA; SALVADÓ; DEL POZO, 2001; SHI et al., 2015; TANG et al., 2012). A energia que é fornecida ao sistema quando o ultrassom é aplicado provém da contração e expansão do cristal de quartzo piezoelétrico presente na haste do sonificador quando uma corrente elétrica alternada é aplicada. Esta energia, quando fornecida ao líquido, provoca uma vibração mecânica (força de cisalhamento) resultando no processo de cavitação acústica. Este processo consiste na formação e colapso de bolhas de ar de implosão violenta, que causa uma turbulência de alta velocidade na dispersão, responsável pela diminuição do tamanho das gotículas primárias de óleo (GOGATE; KABADI, 2009; KENTISH et al., 2008; PESHKOVSKY; BYSTRYAK, 2014). Quanto menor a frequência do ultrassom, maior o diâmetro das bolhas de ar formadas e maior a violência de sua implosão, com conseqüente maior turbulência do meio (SINGH; HUSSEINI; PITT, 2012). A alta turbulência do meio pode resultar no aumento da temperatura, aumento este que não deve ser excessivo a ponto de degradar os componentes da dispersão. Desta forma, o ultrassom de baixa frequência foi utilizado no preparo das nanoemulsões com parâmetros que evitassem o aquecimento excessivo durante o preparo. Esses parâmetros (amplitude, 50% e tempo de aplicação, 5 min) são também os que resultaram em maior eficiência na redução do tamanho das gotículas e do PDI em trabalhos descritos na literatura (DE SIQUEIRA et al., 2017; KENTISH et al., 2008).

Os resultados de testes preliminares realizados com diferentes proporções de óleo, tensoativo e co-tensoativo (Tabela 7) foram importantes para definir a proporção

ideal para se obter uma nanoemulsão com as seguintes características desejadas: alta concentração de óleo para possibilitar uma maior incorporação do fármaco lipofílico; diâmetro médio menor do que 300 nm; alta homogeneidade, ou seja, baixo PDI ( $<0,2$ ); e com a mínima concentração de tensoativos possível pois, apesar do efeito promotor de absorção que os tensoativos possuem, uma alta porcentagem deles na nanoemulsão pode diminuir a penetração cutânea do fármaco por reduzir a atividade termodinâmica do sistema e dificultar, assim, a liberação do fármaco (CHEN et al., 2004; HUA et al., 2004; RHEE et al., 2001).

O aumento na concentração de óleo (TCM) nas formulações aliado a menor proporção do tensoativo polissorbato 80 em relação à quantidade de óleo resultou em relativo aumento no diâmetro médio das gotículas (Tabela 7). Assim, a formulação F1, que continha a maior proporção de tensoativo/TCM e a menor concentração de TCM, apresentou gotículas com o menor tamanho médio. Porém, foi também a dispersão com o maior PDI, próximo a 0,3. Já a formulação F5, que continha a maior concentração de TCM e proporção de tensoativo/TCM intermediária, apesar de apresentar o maior diâmetro de gotícula, foi a que se apresentou mais homogênea, com o menor PDI. Uma vez que o tamanho das gotículas dessa formulação, mesmo sendo o maior dentre as proporções testadas, foi menor do que 200 nm e que a maior concentração de óleo pode proporcionar uma maior incorporação da ZnF lipofílica, a formulação F5 foi a escolhida para os estudos subsequentes.

A concentração de ZnF incorporada na nanoemulsão obtida a partir da formulação F5, que variou de mais de 40  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 10) a 50  $\mu\text{g/mL}$  dependendo do meio dispersante ser o PBS ou a água, foi satisfatória devido a alta eficiência fotodinâmica deste FS. Vale ressaltar ainda que a nanoemulsão desenvolvida foi capaz de solubilizar uma concentração de ZnF maior do que outros sistemas nanoestruturados lipídicos descritos na literatura (DE LIMA et al., 2017; DE SIQUEIRA et al., 2017; GARCIA et al., 2011; ROSSETTI et al., 2011). Por exemplo, a ZnF foi incorporada em lipossomas (GARCIA et al., 2011), microemulsão (ROSSETTI et al., 2011) e nanoemulsão (DE SIQUEIRA et al., 2017) nas concentrações de 1  $\mu\text{g/mL}$ , 7  $\mu\text{g/mL}$  e 35  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, concentrações essas todas inferiores a mínima incorporada na nanoemulsão ora desenvolvida.

Quando a nanoemulsão foi preparada com PBS na fase aquosa para conferir íons necessários ao transporte da corrente elétrica, o valor de pH foi alterado de 6,4 para cerca de 7 e o valor de potencial zeta diminuiu (Tabela 10). Essa redução pode

ser explicada pelo simples fato de que o tampão é formado por íons e o potencial zeta é um parâmetro que sofre influência das mudanças na interface com o meio dispersante em função da dissociação de grupos funcionais na superfície das gotículas ou da adsorção de íons presentes no meio de dispersão (SCHAFFAZICK et al., 2003). Porém, é importante ressaltar que apesar desta diminuição no potencial zeta, a nanoemulsão ainda permaneceu com a característica catiônica desejada.

As demais características de tamanho e polidispersividade foram similares as obtidas pela formulação preparada na ausência de íons. No entanto, a caracterização do tamanho médio das gotículas pela técnica do NTA resultou em um valor um pouco maior em relação ao valor obtido por DLS (Tabela 10). Essa diferença ocorre porque as técnicas diferem entre si no fato de que o NTA é capaz de identificar e rastrear partículas individualmente, enquanto que o DLS identifica as flutuações na intensidade da luz dispersa causada por um conjunto de gotículas (FILIPE; HAWE; JISKOOT, 2010). Sendo assim o NTA é uma técnica de maior sensibilidade e resolução e que permite também a determinação da concentração de gotículas. Em termos de homogeneidade, tanto a análise por DLS quanto a análise por NTA confirmaram a distribuição monomodal do tamanho das gotículas (Figura 23), ou seja, todas se encontram dentro de uma mesma faixa de tamanho, garantindo que quando administradas topicamente elas apresentem as mesmas características de distribuição, interação e partilha com a pele. Além disso, essa propriedade também possibilita a aplicação dessa nanoemulsão por outras vias, como por exemplo a intravenosa.

A estabilidade da nanoemulsão desenvolvida foi adequada, mantendo os parâmetros de tamanho médio das gotículas, PDI e potencial zeta por 60 dias (Figura 25). A diminuição do pH notada após 60 dias de armazenamento provavelmente ocorreu em função da hidrólise dos triglicerídeos que compõe a fase oleosa da nanoemulsão, levando a formação de ácidos graxos livres (HERMAN; GROVES, 1993), uma vez que as nanoemulsões foram desenvolvidas sem a adição de agente antioxidante e não foram armazenadas em atmosfera livre de oxigênio.

Com o intuito de verificar a influência da nanoemulsão na concentração de ZnF disponibilizada para as células tumorais capaz de causar a morte das células do melanoma empregando a TFD, além de avaliar o efeito da associação do bevacizumabe à nanoemulsão contendo ZnF, estudos em cultura de células de melanoma murino B16F10 foram realizados. Como esperado, na ausência de

irradiação a ZnF praticamente não foi citotóxica para esta linhagem celular tanto quando disponibilizada para as células a partir de uma solução simples como quando incorporada na nanoemulsão (barras pretas Figura 27 e 29a). Entretanto, quando fotossensibilizada pela luz a 660 nm e 8 J/cm<sup>2</sup> o efeito fototóxico da ZnF foi evidenciado (Figura 27 barras brancas e Figura 29a barras cinzas) e constatou-se que a incorporação da ZnF na nanoemulsão potencializou ainda mais a atividade fotodinâmica deste FS sobre as células tumorais em relação a ZnF em solução (Figura 30).

O valor de IC<sub>50</sub> obtido para a nanoemulsão de ZnF quando irradiada com o LED de 660 nm na dose de 8 J/cm<sup>2</sup> foi de 191,7 ± 6,3 ng/mL (Figura 29a), já para a ZnF em solução não foi possível obter um valor de IC<sub>50</sub> pois o perfil de fototoxicidade apresentado não foi linear em função da concentração (Figura 27). Esse perfil também foi verificado por Soares et al. (2011) ao avaliarem a fototoxicidade da ZnF livre sobre células de adenocarcinoma humano de pulmão (A549) e observarem que a atividade fotobiológica da ZnF não apresentou um perfil dose-dependente. Este comportamento provavelmente se deve a baixa solubilidade da ZnF livre em água, que faz com que ela se agregue quando diluída no meio de cultura.

As ftalocianinas possuem forte tendência em formar dímeros em meio aquoso, os quais apresentam menor atividade fotodinâmica devido a uma reduzida capacidade de sensibilização pela luz (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004). Desta forma, pode-se sugerir que a maior fototoxicidade da ZnF quando incorporada na nanoemulsão está relacionada com o aumento da solubilidade aquosa da ZnF por este sistema de liberação e conseqüentemente menor agregação do fármaco em meio biológico.

Para confirmar esta hipótese, a solução de ZnF e a nanoemulsão de ZnF foram diluídas em meio de cultura nas mesmas concentrações e seus espectros de fluorescência foram avaliados. A intensidade de fluorescência emitida pela ZnF é um parâmetro indicativo da atividade fotodinâmica da molécula uma vez que quando agregada a ZnF tem sua fluorescência suprimida (DE SOUZA et al., 2018). Pode-se observar na Figura 31 que a intensidade de fluorescência emitida pela nanoemulsão de ZnF foi muito maior do que a emitida pela solução de ZnF, sugerindo a presença de agregados desta quando em solução. De fato, a análise da solução de ZnF em meio de cultura indicou a presença de partículas na faixa de 18 nm e com alto grau de polidispersão (Tabela 11). Sabendo que uma molécula de ZnF tem o tamanho de

1,19 nm (OLSZOWSKI et al., 2017), o valor 15 vezes maior obtido sugere a formação de agregados moleculares de ZnF. A nanoemulsão de ZnF, por outro lado, se mostrou estável em meio de cultura pois manteve o tamanho de gotícula determinado antes da diluição em meio de cultura.

A atividade fotobiológica também está diretamente relacionada com o *uptake* celular do agente fotossensibilizante e da sua localização intracelular (DA VOLTA SOARES et al., 2011). Na TFD o dano tecidual ocorre através da ação citotóxica das espécies reativas de oxigênio, principalmente oxigênio singleto, que possuem um tempo de meia vida curto nos sistemas biológicos (microsegundos) e consequentemente um raio de ação menor do que 20 nm, fazendo com que a eficiência da TFD dependa muito da adequada distribuição e localização do fotossensibilizador nas organelas celulares (FABRIS et al., 2001). O *uptake* celular da ZnF quando veiculada pela nanoemulsão demonstrou ser aproximadamente 3 vezes maior do que o *uptake* da ZnF em solução (Figuras 32 e 33). Sua localização intracelular foi verificada predominantemente em regiões perinucleares (Figura 34), indicando que a mesma pode estar agindo em organelas como a mitocôndria, lisossomos e principalmente retículo endoplasmático, assim como observado em outros estudos (AVŞAR et al., 2016; FABRIS et al., 2001; IDRIS et al., 2012; JIANG et al., 2014).

Curiosamente, a associação do bevacizumabe e ZnF na nanoemulsão potencializou ainda mais a morte das células de melanoma frente a irradiação (Figura 30), ocasionando uma redução significativa de 3,4 vezes na concentração média de ZnF necessária para matar 50% das células tumorais. A priori, não era esperada nesses estudos qualquer influência do bevacizumabe sobre a viabilidade celular, como observado na análise do bevacizumabe em solução (Figura 28), uma vez que seu mecanismo de ação envolve a inibição da angiogênese tumoral através do bloqueio de VEGF. No entanto, células de melanoma são capazes de produzir e secretar VEGF, especialmente em situações de hipóxia (CAMACHO et al., 2013; RIBATTI; ANNESE; LONGO, 2010). Como a irradiação das células pela luz causa o consumo de oxigênio (princípio da TFD), é provável que as células B16F10 tenham secretado o VEGF após a irradiação, o qual foi consequentemente bloqueado pelo bevacizumabe, levando a morte celular de mais células do que quando o meio foi exposto apenas a nanoemulsão contendo ZnF. A redução observada no valor de IC50 da ZnF quando associada ao bevacizumabe na TFD pode, portanto, ser resultado da

inibição da proliferação celular causada pelo bevacizumabe. De fato, Filali et al. (2012) demonstraram que o tratamento com bevacizumabe em células B16F10 em condições de hipóxia *in vitro* ocasionou a diminuição da proliferação celular.

Em células endoteliais, o bevacizumabe quando incorporado na nanoemulsão demonstrou, através da metodologia do *scratch*, manter seu efeito inibitório sobre a migração celular ao retardar o fechamento do espaço criado na monocamada celular (Figuras 35 e 36). Após 7 h de exposição das células endoteliais à solução e à nanoemulsão contendo bevacizumabe, somente a solução apresentou diferença significativa em relação ao controle, resultando numa menor porcentagem de migração das células (maior inibição). Porém, com o passar do tempo de exposição, o contato com a nanoemulsão resultou em maior inibição da migração celular, principalmente após 24 h (Figura 36). Esse resultado pode ser correlacionado com a pronta entrega do bevacizumabe que ocorre quando o mesmo se encontra em solução, o que resulta em um efeito imediato, porém não duradouro, visto que o fármaco está também mais suscetível a degradação. Por outro lado, a administração por meio da nanoemulsão garante maior estabilidade para o fármaco devido a sua liberação lenta e gradual, gerando um efeito mais tardio e pronunciado (HAGIGIT et al., 2010; RAMREDDY; KANDADI; VEERABRAHMA, 2012; SUN et al., 2012). Este resultado sugere que o bevacizumabe está ativo na nanoemulsão e que sua incorporação não reduziu seu efeito biológico. É importante ressaltar também que, como a linhagem endotelial utilizada é capaz de secretar VEGF em cultura (YANG; JAGER; GROSSNIKLAUS, 2010), este experimento foi conduzido sem a suplementação de VEGF no meio, um protocolo muitas vezes empregado neste tipo de estudo a fim de permitir maior visualização do efeito de fármacos antiangiogênicos (CAO et al., 2010; HEIN; GRAVER, 2013; LIU et al., 2014).

Após verificar a eficiência da nanoemulsão desenvolvida sob cultura de células *in vitro*, investigou-se a sua influência na penetração cutânea da ZnF. Diversos estudos demonstraram a capacidade de sistemas nanoestruturados de aumentar o penetração de FSs (ARAÚJO; THOMAZINE; LOPEZ, 2010; DRAGICEVIC-CURIC et al., 2008; PIERRE et al., 2001; PRIMO et al., 2008). No entanto, nenhum deles utilizou como controle uma formulação contendo os mesmos componentes do sistema de liberação, nas mesmas concentrações. Desta forma, para avaliar a eficiência da nanoemulsão como sistema de administração tópica de fármacos com características hidrofóbicas, uma emulsão, de composição idêntica a da nanoemulsão foi também



obtida e caracterizada (Tabela 8) e a influência do tamanho das gotículas na incorporação e penetração cutânea da ZnF foi verificada.

A nanoemulsão, como é possível visualizar na Figura 22, foi capaz de incorporar uma quantidade 2,5 vezes maior de ZnF do que a emulsão. Ficou nítido, neste caso, a influência positiva que o tamanho reduzido das gotículas (escala nanométrica) tem na capacidade de incorporação de fármacos extremamente hidrofóbicos como a ZnF.

Já os estudos de penetração cutânea passiva *in vitro* demonstraram que a redução do tamanho das gotículas favoreceu a penetração da ZnF na pele (Figura 37), uma vez que concentrações mais altas de fármaco foram quantificadas no estrato córneo e na E+D quando a nanoemulsão foi aplicada. As características dinâmicas das dispersões de líquidos imiscíveis estabilizados por agentes emulsionantes aliados ao pequeno tamanho das gotículas da nanoemulsão, favorecem as interações com as células da pele e podem causar certa desordem do estrato córneo, facilitando a penetração do fármaco (RAI et al., 2018).

A maior parte do fármaco que penetrou a pele, no entanto, ficou retida no estrato córneo, não difundindo para a E+D. Este comportamento é característico de substâncias lipofílicas, como a ZnF, que apresentam grande afinidade pelo estrato córneo (DA SILVA et al., 2011) e não se partilham para as camadas mais profundas da pele onde as células tumorais se localizam. Além disso, a própria massa tumoral, juntamente com seu microambiente peculiar, fornece uma barreira significativa para a penetração de fármacos (BYRNE; YEH; DESIMONE, 2018).

A iontoforese, método físico de aumento da penetração cutânea de fármacos, vem sendo utilizada em combinação com nanocarreadores para induzir um efeito sinérgico sobre o aumento da penetração de fármacos na pele (BERNARDI et al., 2016; HUBER et al., 2015; PETRILLI et al., 2018; TAVEIRA et al., 2014). Assim, a penetração *in vitro* com aplicação da iontoforese foi realizada com a emulsão e a nanoemulsão de ZnF para aumentar a penetração deste fotossensibilizador e também investigar se tal aumento ocorre na mesma proporção, independentemente do tamanho da gotícula da dispersão na qual o fármaco é administrado. Os resultados revelaram que ambas as formulações, quando submetidas a 30 min de iontoforese a 0,5 mA/cm<sup>2</sup>, aumentaram a penetração de ZnF na pele em comparação com a administração passiva (Tabela 13). A iontoforese da nanoemulsão foi mais efetiva do que a iontoforese da emulsão, resultando em maiores quantidades de ZnF tanto no

estrato córneo como na E+D (Figura 38). O maior tempo de aplicação da iontoforese (60 min) duplicou a penetração de ZnF no estrato córneo quando a emulsão foi aplicada (Figura 38a), mas diminuiu a quantidade de fármaco extraído da E+D (Figura 38b, Tabela 13). Para a nanoemulsão, os 60 min de aplicação da iontoforese resultaram em uma redução de mais de 2 vezes na quantidade de ZnF recuperada em toda a pele dermatomizada em relação a aplicação da iontoforese por 30 min (Figura 38, Tabela 13).

Como o estudo de estabilidade das formulações utilizadas para o estudo de penetração sob aplicação de 60 min da corrente elétrica não demonstraram alterações no tamanho médio das gotículas e principalmente na concentração de ZnF (Tabela 12), é pouco provável que a diminuição da concentração de fármaco na pele após os 60 min de aplicação da iontoforese se deva a degradação do fármaco. Sendo assim, uma hipótese provável para explicar essa diminuição da quantidade de fármaco na pele em função do tempo de aplicação da iontoforese é que o fármaco tenha alcançado a solução receptora e, por isso, a concentração encontrada na pele tenha diminuído. Porém, a análise da solução receptora pelo método analítico desenvolvido não possibilitou a quantificação da ZnF. Embora o experimento tenha sido conduzido utilizando uma dose infinita de fármaco, foi realizado por apenas 1 h. Portanto, é plausível supor que o estado estacionário ainda não tenha sido alcançado neste tempo de experimento e, portanto, a quantidade de fármaco que chegou à solução receptora após 1 h seja menor do que a quantidade encontrada nas camadas da pele. Ainda, a quantidade de fármaco que chegou à solução receptora foi diluída em 15 mL do meio receptor, ao contrário da quantidade encontrada na pele, que foi extraída com um volume máximo de 5 mL de DMSO. Sabendo disso, é coerente supor que a ZnF permeada não foi quantificada no meio receptor devido à limitação da sensibilidade do método analítico. Portanto, como a ZnF não se degrada na presença da corrente elétrica (Tabela 12) e a quantidade de fármaco que penetra a pele em função do tempo é cumulativa, é possível sugerir que os 60 min de iontoforese da nanoemulsão potencializaram a penetração cutânea da ZnF, a qual alcançou a solução receptora, mas não pode ser ali quantificada devido a sensibilidade do método analítico. Acredita-se que a aplicação da iontoforese por um tempo maior empurrou o fármaco para o meio receptor, resultando em uma menor quantificação nas camadas da pele em relação ao resultado obtido com a aplicação por 30 min, pelo menos enquanto o estado estacionário não é alcançado.

Desta forma, é interessante notar que o tamanho nanométrico das gotículas da nanoemulsão parece aumentar não só a penetração passiva da ZnF em relação a emulsão mas também potencializar a influência da iontoforese, uma vez que mais ZnF foi quantificada tanto no estrato córneo como na E+D quando a nanoemulsão foi submetida à esta técnica.

O efeito da iontoforese na permeação cutânea da ZnF *in vitro* sugere que a aplicação da corrente elétrica de 0,5 mA/cm<sup>2</sup> provavelmente será suficiente para superar a barreira tumoral e permitir que o fármaco se distribua no tumor.

Para confirmar esta hipótese e verificar se a iontoforese da nanoemulsão é capaz de aumentar a penetração de ZnF no tumor, foram realizados estudos *in vivo* em modelo de melanoma murino. A iontoforese foi aplicada por até 30 minutos já que este foi o tempo em que maior quantidade de ZnF foi observada na E+D na iontoforese *in vitro* (Figura 38).

A iontoforese da nanoemulsão de ZnF diretamente no local do tumor permitiu a penetração da ZnF na pele mesmo com apenas 5 minutos de aplicação, embora a intensidade de fluorescência do fármaco tenha aumentado em função do aumento do tempo de iontoforese (Figura 39). Após 5 min, a penetração de ZnF parece ocorrer principalmente através dos apêndices e sulcos cutâneos, com conseqüente acúmulo do fármaco lipofílico na camada hipodérmica. No entanto, na aplicação da iontoforese por tempos maiores (15 e 30 min), a fluorescência vermelha característica da ZnF pode ser observada em toda a extensão da pele, provavelmente devido a uma melhor distribuição cutânea da nanoemulsão de ZnF. No entanto, somente após 30 minutos de iontoforese é que foi possível visualizar a ZnF no tumor. Assim, nota-se que um tempo mais longo de aplicação de corrente elétrica é necessário para favorecer a entrada de uma maior concentração de ZnF capaz de superar a barreira tumoral e atingir as células tumorais. Além disso, a presença de ZnF no tumor após 30 min de iontoforese confirma a hipótese de que a menor quantidade de ZnF encontrada na pele quando veiculada pela nanoemulsão após 60 min de iontoforese *in vitro* (Figura 38) resultou no aumento da permeação do fármaco através da pele atingindo a solução receptora.

Ressalta-se que os resultados referentes ao desenvolvimento da nanoemulsão e o estudo da influência da iontoforese da nanoemulsão na penetração cutânea da ZnF, fármaco lipofílico modelo que não se beneficia normalmente da iontoforese devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso, foram publicados em 2018 em

revista de seletiva política editorial e de elevada relevância para a área da Farmácia sob o título “Nanoemulsion as a Platform for Iontophoretic Delivery of Lipophilic Drugs in Skin Tumors” (DALMOLIN & LOPEZ, *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 214; doi:10.3390/pharmaceutics10040214).

É interessante ressaltar que se tratando de um câncer de pele do tipo melanoma, um dos principais obstáculos no tratamento por TFD é a presença de cromóforos endógenos na pele como a melanina, a hemoglobina, lípidos e proteínas que competem com o FS pela luz empregada durante a TFD (MONGE-FUENTES; MUEHLMANN; DE AZEVEDO, 2014). Consequentemente, mesmo se tratando de um FS de segunda geração que absorve luz em comprimentos de onda mais altos, onde a absorção destas moléculas endógenas pela luz é menor, altas concentrações de ZnF no tumor são necessárias para uma resposta eficaz da TFD. A visualização da fluorescência correspondente a ZnF no tumor (Figura 39) é um forte indicador de que o FS que foi capaz de se distribuir no tumor está fotoativo (não agregado).

Para verificar a eficácia da nanoemulsão desenvolvida, experimentos *in vivo* foram conduzidos em camundongos C57BL6 utilizando um modelo xenográfico de melanoma, induzido através da inoculação subcutânea de células B16F10. Essa linhagem tem alto potencial metastático para órgãos viscerais distantes e é muito utilizada para estudos *in vivo* devido ao rápido padrão de crescimento, sendo capaz de induzir a morte dos camundongos dentro de duas a quatro semanas após a inoculação (KUZU et al., 2015).

O tratamento ao qual os animais foram submetidos foi constituído de duas doses, uma após 5 dias da inoculação do tumor (referido como dia 1) e a outra com intervalo de 5 dias do primeiro tratamento (referido como dia 5), por duas diferentes vias de administração, a via tópica com aplicação de 30 min de iontoforese e a via intratumoral. A dose de ZnF e bevacizumabe aplicada por meio da nanoemulsão no tratamento intratumoral foi de 0,2 mg/kg e 4 mg/kg, respectivamente. Levando-se em conta que os animais possuem em torno de 20 g de massa corporal, eles receberam em torno de 4 µg de ZnF e 80 µg de bevacizumabe. Para o tratamento tópico a nanoemulsão continha 40 µg/mL de ZnF e 1 mg/mL de bevacizumabe, ou seja, aproximadamente 10 vezes mais fármaco do que a administração intratumoral. Esta dose foi escolhida com base nos resultados obtidos no estudo de penetração cutânea *in vitro* com a aplicação da iontoforese (Figura 38), o qual indicou que a quantidade de ZnF que penetra na pele é em torno de 10% da quantidade aplicada. Desta forma,

a quantidade de fármaco que penetra a pele dos animais equivale a dose administrada por via intratumoral.

A massa corporal dos animais avaliada ao longo do experimento não sofreu mudanças significativas nem mesmo com a aplicação da nanoemulsão contendo os fármacos seguida da TFD com o laser na dose de  $100 \text{ J/cm}^2$  (Figura 40), o que sugere que o tratamento foi bem tolerado pelos animais.

Quanto ao efeito sobre a redução do crescimento tumoral, os grupos que receberam a administração da nanoemulsão branca (NB), sob irradiação ou não, bem como a nanoemulsão de ZnF (NF) na ausência da luz não demonstraram diferença significativa em relação ao controle em nenhum dos tempos avaliados por ambas as vias de administração (Figuras 41 e 42), indicando que a NB e a NF sem irradiação não produziram efeito sobre o melanoma, confirmando os resultados obtidos *in vitro* da não toxicidade dessas formulações (Figura 26 e 29a).

O tratamento do tumor com a NF seguido da TFD, no entanto, apresentou efeito positivo na redução do crescimento tumoral (Figuras 41 e 42). A administração da formulação por iontoforese parece ter desencadeado uma resposta ao tratamento mais rápida do que a administração por via intratumoral, já que seu efeito pode ser observado após 8 e 10 dias, respectivamente, para iontoforese e injeção intratumoral. Resultado semelhante foi observado com o tratamento realizado com a nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe (NFB), quando, novamente, a influência da formulação na redução do crescimento tumoral já foi observada logo após 8 dias do início do tratamento (Figura 42), enquanto o efeito da formulação administrada por via injetável foi observado somente após 10 dias (Figura 41). A iontoforese de imunolipossomas também mostrou ser mais efetiva no tratamento de tumores não melanoma do que a administração subcutânea (PETRILLI et al., 2018). No tratamento do melanoma, um estudo de co-administração de STAT3 siRNA e um inibidor seletivo do receptor de c-kit em nanopartículas de ouro por iontoforese demonstrou um efeito tão positivo quanto o obtido pela administração intratumoral (LABALA et al., 2017).

Os grupos que receberam o tratamento com a nanoemulsão de ZnF e bevacizumabe (NFB) sem irradiação também apresentaram redução significativa do crescimento tumoral quando administrados por iontoforese, após 8 e 10 dias do início do tratamento (Figura 42). A administração intratumoral da NFB sem irradiação não resultou, no entanto, em redução do crescimento tumoral (Figura 41). Este resultado indica que a iontoforese da nanoemulsão desenvolvida foi capaz de entregar o

bevacizumabe para as células tumorais de maneira mais efetiva do que a administração intratumoral, possibilitando uma resposta positiva de redução do crescimento tumoral devido a imunoterapia.

A iontoforese da NFB seguida da TFD reduziu em maior proporção o crescimento tumoral do que o mesmo tratamento na ausência da luz, já que a porcentagem de aumento do tumor foi de  $95 \pm 77\%$  na TFD e de  $407 \pm 304\%$  na sua ausência (Tabela 14). Desta forma, a associação da TFD e da imunoterapia parece ser vantajosa no tratamento do melanoma, mas estudos mais prolongados e com um número maior de animais são necessários para confirmar esta hipótese.

Apesar de conter o crescimento do tumor, em nenhum dos grupos houve redução estatisticamente significativa do volume tumoral em relação ao volume inicial (medido antes do primeiro tratamento). Esse resultado é esperado e comumente visualizado na literatura em estudos *in vivo* empregando a TFD (CAMERIN et al., 2010; CHEN et al., 2015; HADDAD et al., 1998; LIN et al., 2016; MONGE-FUENTES et al., 2017; MROZ et al., 2010; PARK; NA, 2013; RAPOZZI et al., 2014) quando se utiliza esta linhagem celular devido a sua agressividade.

Ainda que o tratamento não tenha levado a cura dos animais, tanto na administração intratumoral quanto na administração tópica, o grupo tratado com os dois fármacos em associação na nanoemulsão e submetidos a TFD foi o que apresentou a menor porcentagem de progressão tumoral após 15 dias da inoculação (Tabela 14). Desta forma, os dados obtidos analisados em conjunto sugerem que a associação das duas terapias (TFD e imunoterapia) em um único sistema, foi mais efetiva no tratamento do melanoma do que a administração isolada de cada um dos fármacos.

Curiosamente notou-se que não houve relação direta entre a massa do tumor e a ausência de metástase, já que em alguns animais que apresentaram tumor de massa bem pequena foi verificada a presença de metástase, enquanto que outros com um tumor de maior massa não a apresentavam. Isso pode ser explicado pelo fato de que muitas vezes o tumor pode estar repleto de células tumorais, porém muitas delas já em processo de apoptose. Ainda, quanto a presença de metástase, verificou-se que apesar das células B16F10 ocasionarem metástase principalmente no pulmão (MARTÍNEZ CONESA et al., 2005), neste estudo células metastáticas foram detectadas, de acordo com a análise histológica, apenas no baço e no fígado dos animais (Figura 44 e 45). É interessante ressaltar que nos grupos tratados com a NFB

e TFD, tanto por via intratumoral como pela via tópica, nenhum dos animais apresentou metástase, indicando que a associação das terapias pode retardar a ocorrência de metástases.

Para examinar se a redução do crescimento do tumor ocorreu como resultado do aumento da apoptose das células tumorais, os cortes histológicos dos tumores de melanoma foram analisados através do ensaio do TUNEL que é capaz de detectar quebras internas e finais no DNA que são frequentemente observadas nos estágios iniciais da apoptose. A apoptose é um processo complexo de morte celular programada que envolve múltiplas etapas e que pode ser iniciada através da ativação de receptores de morte ou pela liberação de citocromo C pela mitocôndria, processo controlado pelas proteínas da família Bcl-2 que culmina na ativação de caspases. Algumas caspases específicas quando ativas clivam substratos celulares, como o DNA e proteínas do citoesqueleto da células levando, conseqüentemente, a condensação de cromatina e retração nuclear (núcleos picnóticos observados na Figura 43) e à fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos (HSEU et al., 2016; MROZ et al., 2011).

Na Figura 46 é possível verificar que a marcação positiva para o TUNEL no núcleo das células tumorais foi observada nos grupos que foram submetidos a TFD após o tratamento com a NF e a NFB, tanto por via intratumoral como por via tópica, e também no grupo tratado topicamente com a NFB mas sem irradiação, indicando a presença de células em processo de apoptose. Nota-se ainda que no tratamento tópico a intensidade de fluorescência da marcação positiva pareceu maior.

Sabe-se que um dos principais mecanismos pelo qual a TFD induz a morte celular é através da apoptose (BACELLAR et al., 2015; HE et al., 2009; SHEN et al., 2004; SIMON; HAJ-YEHIA; LEVI-SCHAFFER, 2000). Os mecanismos de apoptose desencadeados pelas espécies reativas de oxigênio e oxigênio singlete geradas na TFD geralmente incluem a ativação de receptores, caspases e proteínas da família Bcl-2 (AGOSTINIS et al., 2011). Assim, a presença de núcleos apoptóticos em ambos os grupos tratados com a NF e submetidos à irradiação pode ser resultado da fototoxicidade induzida pela TFD. Por outro lado, a marcação positiva observada também no grupo tratado com a NFB sem irradiação, a apoptose provavelmente tenha sido induzida pelo bloqueio de VEGF pelo bevacizumabe. O VEGF está envolvido com a super expressão de Bcl-2 que leva a inibição do processo de apoptose (BEIERLE; STRANDE; CHEN, 2002). Uma vez que o bevacizumabe bloqueia a molécula de

VEGF este mecanismo é descompensado resultando na morte celular por apoptose. Desta forma, a presença de células TUNEL positivas quando o tumor foi tratado topicamente com a NFB sem ser submetido a irradiação, correlaciona-se e corrobora com a diferença significativa observada neste mesmo grupo em relação ao controle nos resultados da porcentagem de aumento do tumor (Figura 42).

Assim, os resultados obtidos revelam que a administração tópica com a aplicação da iontoforese da nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe pareceu ser mais efetiva na entrega dos fármacos e conseqüentemente na redução do crescimento do tumor do que a administração intratumoral. Além disso, a associação dos dois tipos de terapia (imunoterapia e TFD) com mecanismos de ação diferentes num mesmo sistema de liberação se mostrou promissora para o tratamento do melanoma.



## 7 CONCLUSÃO

Uma nanoemulsão O/A catiônica com alta concentração de óleo e baixa concentração de tensoativos foi desenvolvida com sucesso por emulsificação ultrassônica, apresentando tamanho médio inferior a 200 nm, baixa polidispersividade e estabilidade frente a corrente elétrica. A nanoemulsão foi capaz de incorporar o bevacizumabe e até 50  $\mu\text{g/mL}$  de ZnF, a qual foi quantificada seletivamente também na pele por um método espectrofluorimétrico validado. Em células de melanoma B16F10, a ZnF demonstrou ter maior potencial fototóxico quando incorporada na nanoemulsão e a associação do bevacizumabe acentuou ainda mais esse efeito, já que o valor de IC50 obtido para a nanoemulsão contendo ZnF e bevacizumabe após irradiação foi pelo menos 3 vezes menor do que o valor de IC50 da nanoemulsão contendo apenas ZnF. Além disso, a veiculação pela nanoemulsão aumentou em 4 vezes a internalização celular da ZnF pelas células tumorais, quando comparado ao fármaco em solução. A incorporação do bevacizumabe na nanoemulsão possibilitou que este fármaco inibisse a migração de células do endotélio mesmo após longo período em contato com as células, evitando sua rápida degradação. A iontoforese da nanoemulsão aumentou a permeação da ZnF na pele em relação ao controle (emulsão contendo os mesmos componentes da nanoemulsão) e permitiu que a ZnF alcançasse o melanoma induzido em camundongos após 30 min de aplicação tópica. A contribuição da iontoforese da nanoemulsão para a permeação cutânea da ZnF e do bevacizumabe resultou numa resposta biológica ao tratamento do melanoma, seguido ou não da TFD, até mesmo mais promissora do que a injeção intratumoral da formulação, uma vez que a inibição do crescimento tumoral se deu mais rapidamente após administração da nanoemulsão por iontoforese do que por via intratumoral. A análise histológica dos tumores tratados indicou que o mecanismo de inibição do crescimento tumoral após a TFD aliada a imunoterapia está relacionado a apoptose das células tumorais. Desta forma, a administração iontoforética da associação de ZnF e de bevacizumabe possibilitada pela nanoemulsão mostrou ser uma alternativa terapêutica promissora para a TFD e imunoterapia do melanoma cutâneo.

## 8 REFERÊNCIAS

ABBASI, N. R. et al. Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma. **JAMA**, v. 292, n. 22, p. 2771, 2004.

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.

AHMANN, D. L. et al. Complete responses and long-term survivals after systemic chemotherapy for patients with advanced malignant melanoma. **Cancer**, v. 63, n. 2, p. 224–7, 1989.

ALJUFFALI, I. A.; LIN, Y.-K.; FANG, J.-Y. Noninvasive approach for enhancing small interfering RNA delivery percutaneously. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 2, p. 265–280, 2016.

ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p. 161–169, 2001.

ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 61–75, 2010.

ARAÚJO, L. M. P. DE C.; THOMAZINE, J. A.; LOPEZ, R. F. V. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 1, p. 48–55, maio 2010.

ARRANGOIZ, R. et al. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Journal of Cancer Treatment and Research**, v. 4, n. 1, p. 1–15, 2016.

ATKINS, M. B. et al. High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated Between 1985 and 1993. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 2105–2105, 1999.

ATKINS, M. B. et al. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. **The Cancer Journal from Scientific American**, v. 6 Suppl 1, p. S11-4, 2000.

AUSTIN, E. et al. Laser and light-based therapy for cutaneous and soft-tissue metastases of malignant melanoma: a systematic review. **Archives of Dermatological Research**, v. 309, n. 4, p. 229–242, 2017.

AVŞAR, G. et al. Intracellular uptake and fluorescence imaging potential in tumor cell of zinc phthalocyanine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, n. 1–2, p. 369–375, 2016.

BACELLAR, I. et al. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell

Death. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20523–20559, 2015.

BAJETTA, E. et al. Multicenter randomized trial of dacarbazine alone or in combination with two different doses and schedules of interferon alfa-2a in the treatment of advanced melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 4, p. 806–811, 1994.

BALDEA, I. et al. Photodynamic Therapy in Melanoma - Where do we Stand? **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 40, p. 5540–5563, 2018.

BALDEA, I.; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma--an update. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 109–18, 2012.

BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p. 21–50, 2010.

BASPINAR, Y.; BORCHERT, H.-H. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions—Is there a benefit of the positive charge? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 247–252, 2012.

BEACK, S. et al. Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot - Chlorin e6 - Hyaluronate conjugate. **Acta Biomaterialia**, v. 26, p. 295–305, 2015.

BEIERLE, E. A.; STRANDE, L. F.; CHEN, M. K. VEGF upregulates Bcl-2 expression and is associated with decreased apoptosis in neuroblastoma cells. **Journal of pediatric surgery**, v. 37, n. 3, p. 467–71, 2002.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401–410, 2003.

BERNARDI, D. S. et al. Effective transcutaneous immunization using a combination of iontophoresis and nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 8, p. 2439–2448, 2016.

BILLANY, G. Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.23, p. 353-356.

BIRCK, A. et al. Expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in primary and metastatic melanoma from the same patients. **Melanoma research**, v. 9, n. 4, p. 375–81, 1999.

BLANK, I. H. Measurement of pH of the Skin Surface: II. pH of the Exposed Surfaces of Adults with No Apparent Skin Lesions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 2, n. 2, p. 75–79, 1939.

BOLFARINI, G. C. et al. In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbituril zinc phthalocyanine complex on melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 115, p. 1–4, 2012.

BOUWSTRA, J. A. et al. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 1, p. 1-36, 2003.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1827–1840, 2012.

BURNETTE, R. R.; ONGPIPATTANAKUL, B. Characterization of the permselective properties of excised human skin during iontophoresis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, n. 10, p. 765–73, 1987.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86–107, 2007.

BYRNE, J. D.; YEH, J. J.; DESIMONE, J. M. Use of iontophoresis for the treatment of cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 284, p. 144–151, 2018.

CAMACHO, X. et al. [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-radiolabeled bevacizumab: In vitro and in vivo evaluation in a melanoma model. **Oncology (Switzerland)**, v. 84, n. 4, p. 200–209, 2013.

CAMERIN, M. et al. The in vivo efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1910–1918, 2010.

CAO, L. et al. In Vitro Screening for Angiostatic Potential of Herbal Chemicals. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 12, p. 6658, 2010.

CARREAU, N.; PAVLICK, A. Revolutionizing treatment of advanced melanoma with immunotherapy. **Surgical Oncology**, 2019.

CARTER, P.; NARASIMHAN, B.; WANG, Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, p. 49–62, 30 jan. 2019.

CASTAGNOS, P. et al. Catanionic vesicles charged with chloroaluminium phthalocyanine for topical photodynamic therapy. in vitro phototoxicity towards human carcinoma and melanoma cell lines. **RSC Advances**, v. 4, n. 74, p. 39372–39377, 2014.

CASTELLANI, A.; PACE, G. P.; CONCIOLI, M. Photodynamic effect of haematoporphyrin on blood microcirculation. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 86, p. 99–102, 1963.

CHANG, B. K. et al. A Pilot Study of Iontophoretic Cisplatin Chemotherapy of Basal and Squamous Cell Carcinomas of the Skin. **Archives of Dermatology**, v. 129, n. 4, p. 425, 1993.

CHANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Optimization of Orange Oil Nanoemulsion Formation by Isothermal Low-Energy Methods: Influence of the Oil Phase, Surfactant,

and Temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 10, p. 2306–2312, 2014.

CHAPMAN, P. B. et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2507–2516, 2011.

CHAUHAN, V. P. et al. Delivery of Molecular and Nanoscale Medicine to Tumors: Transport Barriers and Strategies. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 281–298, 2011.

CHEN, H. et al. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 3, p. 427–36, 2004.

CHEN, Z.-A. et al. Encapsulation of palladium porphyrin photosensitizer in layered metal oxide nanoparticles for photodynamic therapy against skin melanoma. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 5, p. 054205, 2015.

CHIEN, Y. W.; BANGA, A. K. Iontophoretic (transdermal) delivery of drugs: overview of historical development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 5, p. 353–4, 1989.

CHIN, L.; MERLINO, G.; DEPINHO, R. A. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. **Genes & Development**, v. 12, n. 22, p. 3467–81, 1998.

CHIN, Y. et al. Improved Photodynamic Efficacy of Zn(II) Phthalocyanines via Glycerol Substitution. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97894, 2014.

CHING, T. S.; CONNOLLY, P. Simultaneous transdermal extraction of glucose and lactate from human subjects by reverse iontophoresis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 211–23, 2008.

CLAFFEY, K. P. et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. **Cancer Research**, v. 56, n. 1, p. 172–81, 1996.

CONTE, C. et al. Biodegradable core-shell nanoassemblies for the delivery of docetaxel and Zn(II)-phthalocyanine inspired by combination therapy for cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 1, p. 40–52, 2013.

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

CUBAYACHI, C. et al. Needle-free buccal anesthesia using iontophoresis and amino amide salts combined in a mucoadhesive formulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 1193–1201, 2015.

CUI, S. et al. In Vivo Targeted Deep-Tissue Photodynamic Therapy Based on Near-Infrared Light Triggered Upconversion Nanoconstruct. **ACS Nano**, v. 7, n. 1, p. 676–688, 2013.

CULLANDER, C.; GUY, R. H. Sites of Iontophoretic Current Flow Into the Skin: Identification and Characterization with the Vibrating Probe Electrode. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, n. 1, p. 55–64, 1991.

D'SOUZA, S.; OGBODU, R.; NYOKONG, T. The effects of gold coated and uncoated zinc oxide nanohexagons on the photophysicochemical properties of the low symmetry zinc phthalocyanine. **Journal of Molecular Structure**, v. 1099, p. 551–559, 2015.

DALMOLIN, L. F.; LOPEZ, R. F. V. Nanoemulsion as a Platform for Iontophoretic Delivery of Lipophilic Drugs in Skin Tumors. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 1-18, 2018.

DA SILVA, E. R. et al. Improving the topical delivery of zinc phthalocyanine using oleic acid as a penetration enhancer: In vitro permeation and retention. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 5, p. 569–575, 2011.

DA VOLTA SOARES, M. et al. Nanostructured delivery system for zinc phthalocyanine: preparation, characterization, and phototoxicity study against human lung adenocarcinoma A549 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 227–238, 2011.

DAVIDS, L. M.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer Treatment Reviews**, v. 37, n. 6, p. 465–475, 2010.

DE LIMA, R. G. et al. Ultradeformable liposome loaded with zinc phthalocyanine and [Ru(NH.NHq)(tpy)NO]<sup>3+</sup> for photodynamic therapy by topical application. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 184–193, 2017.

DE SIQUEIRA, L. B. de O. et al. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmania* spp. **Nanotechnology**, v. 28, n. 6, p. 065101, 2017.

DE SOUZA, T. F. M. et al. Photophysical and Photochemical Properties and Aggregation Behavior of Phthalocyanine and Naphthalocyanine Derivatives. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 6, p. 1199–1209, 2018.

DEBELE, T.; PENG, S.; TSAI, H.-C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 22094–22136, 2015.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380–387, 2003.

DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 7, p. 35–49, 2018.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 55, n. 1, p. 115–21, 1975.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**, v. 38, n. 8, p. 2628–35, 1978.

DRAGICEVIC-CURIC, N. et al. Temoporfin-loaded invasomes: Development, characterization and in vitro skin penetration studies. **Journal of Controlled Release**, v. 127, n. 1, p. 59–69, 2008.

EGGERMONT, A. M. M. et al. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816–827, 2014.

EROGLU, Z.; RIBAS, A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 8, n. 1, p. 48–56, 2016.

ESPENEL, S. et al. Melanoma: Last call for radiotherapy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 110, p. 13–19, 2017.

**Estatística para Câncer de Pele Melanoma - Instituto Oncoguia**. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistia-para-cancer-de-pele-melanoma/7066/186/>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

FABRIS, C. et al. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **Cancer Research**, v. 61, n. 20, p. 7495–7500, 2001.

FALKSON, C. I. et al. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 5, p. 1743–1751, maio 1998.

FANG, J.-Y. et al. Transdermal iontophoresis of 5-fluorouracil combined with electroporation and laser treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, n. 1–2, p. 241–9, 2004.

FATOUROS, D. G. et al. Visualization studies of human skin in vitro/in vivo under the influence of an electrical field. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 160–170, 2006.

FERRARA, N. et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 391–400, 2004.

FERRARA, N.; HILLAN, K. J.; NOVOTNY, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 2, p. 328–335, 29 jul. 2005.

FERRUCCI, P. F. et al. Dacarbazine in combination with bevacizumab for the treatment of unresectable/metastatic melanoma: A phase II study. **Melanoma Research**, v. 25, n. 3, p. 239–245, 2015.

FILALI, M. et al. Bevacizumab and intraocular tumors: an intriguing paradox. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2454-2467, 2012.

FILIFE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 2010.

FINGAR, V. H. et al. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. **Cancer Research**, v. 52, n. 18, p. 4914–21, 1992.

FINGAR, V. H. Vascular Effects of Photodynamic Therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 14, n. 5, p. 323–328, 1996.

FLAHERTY, K. T. et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 9, p. 809–819, 2010.

FLAHERTY, K. T. et al. Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 18, p. 1694–1703, 2012.

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182–1186, 1971.

FRIEDRICH, R. B. et al. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1131–1136, 2008.

FRONZA, T.; CAMPOS, Á.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558–566, 2004.

FUJITA, K. et al. Anti-tumor effects of bevacizumab in combination with paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v. 18, n. 1, p. 47–51, 2007.

GARCIA, A. M. et al. Photophysical behaviour and photodynamic activity of zinc phthalocyanines associated to liposomes. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 507–514, 2011.

GELFUSO, G. M. et al. The Effects of pH and Ionic Strength on Topical Delivery of a Negatively Charged Porphyrin (TPPS4). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 10, p. 4249–4257, 2008.

GELFUSO, G. M. et al. The influence of positive or negative charges in the passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 249–256, 2011.



GENENTECH. **Proposed Mechanism of Action of Avastin® (bevacizumab)**. Disponível em: <<https://www.avastin-hcp.com/about-avastin/proposed-moa.html>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

GERBER, H. P.; FERRARA, N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 671–680, 2005.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 338–344, 2013.

GLAVIANO, N. R. et al. No difference between doses in skin anesthesia after lidocaine delivered via iontophoresis. **Journal of Sport Rehabilitation**, v. 20, n. 2, p. 187–97, 2011.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 60–72, 2009.

GOMES, E. C. de L. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do fármaco bevacizumabe por cromatografia a líquido de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 608–611, 2012.

GORSKI, D. H.; LEAL, A. D.; GOYDOS, J. S. Differential expression of vascular endothelial growth factor–A isoforms at different stages of melanoma progression. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 197, n. 3, p. 408–418, 2003.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.

GRATIERI, T.; KALARIA, D.; KALIA, Y. N. Non-invasive iontophoretic delivery of peptides and proteins across the skin. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 8, n. 5, p. 645–663, 2011.

GROSS, J. et al. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 30–41, 2016.

GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.

GUY, R. H. et al. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **Journal of Controlled Release**, v. 64, n. 1–3, p. 129–32, 2000.

HADDAD, R. et al. In vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on murine malignant melanoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 241–247, 1998.

HAGIGIT, T. et al. The influence of cationic lipid type on in-vitro release kinetic profiles of antisense oligonucleotide from cationic nanoemulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 248–259, 2008.

HAGIGIT, T. et al. Topical and intravitreal administration of cationic nanoemulsions to deliver antisense oligonucleotides directed towards VEGF KDR receptors to the eye. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 297–305, 2010.

HAGIGIT, T. et al. Ocular antisense oligonucleotide delivery by cationic nanoemulsion for improved treatment of ocular neovascularization: An in-vivo study in rats and mice. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 225–231, 2012.

HARTMAN, R. I.; LIN, J. Y. Cutaneous Melanoma — A Review in Detection, Staging and Management. **Hematology/Oncology Clinics of NA**, v. 33, n. 1, p. 25–38, 2019.

HAUPTSTEIN, S.; PRÜFERT, F.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Self-nanoemulsifying drug delivery systems as novel approach for pDNA drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 487, n. 1–2, p. 25–31, 2015.

HE, G.F. et al. A study on the mechanism of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in vitro and in vivo in cervical cancer. **Oncology Reports**, v. 21, n. 4, p. 861–8, 2009.

HEIN, M.; GRAVER, S. Tumor cell response to bevacizumab single agent therapy in vitro. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

HENDERSON, M. A. et al. Adjuvant lymph-node field radiotherapy versus observation only in patients with melanoma at high risk of further lymph-node field relapse after lymphadenectomy (ANZMTG 01.02/TROG 02.01): 6-year follow-up of a phase 3, randomised controlled trial. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 9, p. 1049–1060, 2015.

HERMAN, C. J.; GROVES, M. J. The influence of free fatty acid formation on the pH of phospholipid-stabilized triglyceride emulsions. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 5, p. 774–6, 1993.

HODI, F. S. et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p. 711–723, 2010.

HODI, F. S. et al. A phase I trial of ipilimumab plus bevacizumab in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15\_suppl, p. 8511–8511, 2011.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n. 1–2, p. 181–186, 2009.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265–273, 2013.

HSEU, Y.C. et al. In vitro and in vivo anti-tumor activity of CoQ<sub>0</sub> against melanoma cells: inhibition of metastasis and induction of cell-cycle arrest and apoptosis through modulation of Wnt/b-catenin signaling pathways. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, p. 22409–26, 2016.

HUA, L. et al. Preparation, Evaluation, and NMR Characterization of Vinpocetine Microemulsion for Transdermal Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 6, p. 657–666, 2004.

HUBER, L. A. et al. Topical Skin Cancer Therapy Using Doxorubicin-Loaded Cationic Lipid Nanoparticles and Iontophoresis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 11, p. 1975–1988, 2015.

HURWITZ, H. et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 23, p. 2335–2342, 2004.

ICH. **Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation : ICH.** Disponível em:

<<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

IDRIS, N. M. et al. In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers. **Nature Medicine**, v. 18, n. 10, p. 1580–1585, 2012.

INCA. **INCA - Instituto Nacional do Câncer.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

ISELE, U. et al. Pharmacokinetics and body distribution of liposomal zinc phthalocyanine in tumor-bearing mice: Influence of aggregation state, particle size, and composition. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 2, p. 166–173, 1995.

IVES, N. J. et al. Adjuvant interferon- $\alpha$  for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis. **European Journal of Cancer**, v. 82, p. 171–183, 2017.

JAYSON, G. C. et al. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. **The Lancet**, v. 388, n. 10043, p. 518–529, 2016.

JELIĆ, S. et al. Comparison of the efficacy of two different dosage dacarbazine-based regimens and two regimens without dacarbazine in metastatic melanoma: a single-centre randomized four-arm study. **Melanoma research**, v. 12, n. 1, p. 91–8, 2002.

JEPPS, O. 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.

JIANG, Z. et al. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 98–104, 2014.

JOUR, G.; IVAN, D.; AUNG, P. P. Angiogenesis in melanoma: An update with a focus on current targeted therapies. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 6, p. 472–483, 2016.

KABEEL, M. M. et al. Combined intravitreal bevacizumab and photodynamic therapy with verteporfin for management of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. **Clin Ophthalmol**, v. 2, n. 1, p. 159–166, 2008.

KALIA, Y. N. et al. Iontophoretic drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 5, p. 619–658, 2004.

KENTISH, S. et al. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 170–175, 2008.

KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 19, p. 2039–2049, 2008.

KESSEL, D.; CASTELLI, M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 2, p. 318–22, 2001.

KEUNG, E. Z.; GERSHENWALD, J. E. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 18, n. 8, p. 775–784, 2018.

KIGASAWA, K. et al. Noninvasive and efficient transdermal delivery of CpG-oligodeoxynucleotide for cancer immunotherapy. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 3, p. 256–265, 2011.

KIM, J.; SANTOS, O. A.; PARK, J.-H. Selective photosensitizer delivery into plasma membrane for effective photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 191, p. 98–104, 2014.

KIM, K. B. et al. BEAM: A Randomized Phase II Study Evaluating the Activity of Bevacizumab in Combination With Carboplatin Plus Paclitaxel in Patients With Previously Untreated Advanced Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 1, p. 34–41, 2012.

KIM, M.; JUNG, H. Y.; PARK, H. J. Topical PDT in the treatment of benign skin diseases: Principles and new applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23259–23278, 2015.

KORCUM, A. F. et al. Radiotherapy-induced decreases in substance P levels may potentiate melanoma growth. **Molecular Medicine Reports**, v. 2, n. 2, p. 319–326, 2009.

KROSL, G.; KORBELIK, M.; DOUGHERTY, G. J. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 71, n. 3, p. 549–55, 1995.

KUZU, O. F. et al. Current State of Animal ( Mouse ) Modeling in Melanoma Research. **Cancer Growth Metastasis**, v. 8, p. 81–94, 2015.

KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098–1107, 2018.

LABALA, S. et al. Effective melanoma cancer suppression by iontophoretic co-delivery of STAT3 siRNA and imatinib using gold nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 525, n. 2, p. 407–417, 2017.

LAI, P. M.; ROBERTS, M. S. An analysis of solute structure-human epidermal transport relationships in epidermal iontophoresis using the ionic mobility: pore model. **Journal of Controlled Release**, v. 58, n. 3, p. 323–33, 1999.

LEE, F. Y. F. et al. Synergistic antitumor activity of ixabepilone (BMS-247550) plus bevacizumab in multiple in vivo tumor models. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 24, p. 8123–8131, 2008.

LEMOS, C. N. et al. Iontophoresis Improved Growth Reduction of Invasive Squamous Cell Carcinoma in Topical Photodynamic Therapy. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0145922, 2016.

LEMOS, C. N. et al. Nanoparticles influence in skin penetration of drugs. In: **Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 187–248.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 2018.

LI, B.-H. et al. Singlet Oxygen Quantum Yields of Porphyrin-Based Photosensitizers for Photodynamic Therapy. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 01, n. 01, p. 141–149, 2008.

LI, X. et al. Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 379, p. 147–160, 2019.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIDDELL, M. R.; LI, S. K.; HIGUCHI, W. I. Transport Behavior of Hairless Mouse Skin During Constant Current DC Iontophoresis I: Baseline Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 4, p. 1475–1487, 2011.

LIMA, A. M. et al. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: Phototoxicity and photodynamic efficiency. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**,

v. 125, p. 146–154, 2013.

LIN, M.-W. et al. A Formulation Study of 5-Aminolevulinic Encapsulated in DPPC Liposomes in Melanoma Treatment. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 7, p. 483–9, 2016.

LIU, J. et al. A bifunctional biosensor for subcutaneous glucose monitoring by reverse iontophoresis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 660, n. 1, p. 8–13, 2011.

LIU, M. et al. Efficacy and safety of BRAF inhibition alone versus combined BRAF and MEK inhibition in melanoma: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Oncotarget**, v. 8, n. 19, p. 32258–32269, 2017.

LIU, Q. et al. Targeted drug delivery to melanoma. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 127, p. 208–221, 2018.

LIU, Y. et al. Effects of the combination of TRC105 and bevacizumab on endothelial cell biology. **Investigational New Drugs**, v. 32, n. 5, p. 851–9, 2014.

LIU, Y.; SAEED SHEIKH, M. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 228, 2014.

LONG, G. V. et al. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 20, p. 1877–1888, 2014.

LOPEZ, R. F. et al. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 3, p. 311–5, 2001.

LOPEZ, R. F. V et al. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. **Journal of Controlled Release**, v. 88, n. 1, p. 65–70, 2003a.

LOPEZ, R. F. V et al. Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis in vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, n. 3, p. 304–8, 2003b.

LOVE, W. G.; VAN DER ZANDEN, B. C. H.; TAYLOR, P. W. Formulation of a Zinc(II)-phthalocyanine-containing topical gel for photodynamic therapy of hyperproliferative skin conditions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 7, p. 705–710, 1997.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 05, n. 02, p. 105–129, 2001.

MAHDI JAFARI, S.; HE, Y.; BHANDARI, B. Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 3, p. 475–485, 2006.

MARTÍNEZ CONESA, C. et al. Treatment of Metastatic Melanoma B16F10 by the Flavonoids Tangeretin, Rutin, and Diosmin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6791–6797, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.

MD, S. et al. Lipid based nanocarriers system for topical delivery of photosensitizers. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1274–1283, 2017.

MEDINA, J.; SALVADÓ, A.; DEL POZO, A. Use of ultrasound to prepare lipid emulsions of lorazepam for intravenous injection. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 216, n. 1–2, p. 1–8, 2001.

MERINO, V.; CASTELLANO, A. L.; DELGADO-CHARRO, M. B. Iontophoresis for Therapeutic Drug Delivery and Non-invasive Sampling Applications. In: **Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 77–101.

MEYLE, K. D.; GULDBERG, P. Genetic risk factors for melanoma. **Human Genetics**, v. 126, n. 4, p. 499–510, 2009.

MICHAILOV, N. et al. Fluence rate effects on photodynamic therapy of B16 pigmented melanoma. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 37, n. 1–2, p. 154–7, 1997.

MIDDLETON, M. R. et al. Randomized Phase III Study of Temozolomide Versus Dacarbazine in the Treatment of Patients With Advanced Metastatic Malignant Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 1, p. 158–158, 2000.

MILLER, K. et al. Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 26, p. 2666–2676, 2007.

MOCELLIN, S. et al. Interferon Alpha Adjuvant Therapy in Patients With High-Risk Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 7, p. 493–501, 2010.

MONGE-FUENTES, V. et al. Journal of Photochemistry & Photobiology , B : Biology Photodynamic therapy mediated by acai oil ( Euterpe oleracea Martius ) in nanoemulsion : A potential treatment for melanoma. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 166, p. 301–310, 2017.

MONGE-FUENTES, V.; MUEHLMANN, L. A.; DE AZEVEDO, R. B. Perspectives on the application of nanotechnology in photodynamic therapy for the treatment of melanoma. **Nano Reviews**, v. 5, n. 1, p. 24381, 2014.

MORO, N.; MAUCH, C.; ZIGRINO, P. Metalloproteinases in melanoma. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 1–2, p. 23–29, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MROZ, P. et al. Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of

melanoma to photodynamic therapy. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 9, p. 3160–3170, 2010.

MROZ, P. et al. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516–2539, 2011.

NCI. **National Cancer Institute**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/skin>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

NEWLANDS, E. S. et al. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–61, 1997.

NIKOLAOU, V. et al. Antiangiogenic and antiapoptotic treatment in advanced melanoma. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 257–263, 2013.

NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 273–284, 2004.

OCHSNER, M. Light scattering of human skin: A comparison between zinc(II)—phthalocyanine and photofrin II®. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 1–2, p. 3–9, 1996.

OGAWARA, K. et al. Efficient anti-tumor effect of photodynamic treatment with polymeric nanoparticles composed of polyethylene glycol and polylactic acid block copolymer encapsulating hydrophobic porphyrin derivative. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 154–160, 2016.

OGUNSIPE, A.; MAREE, D.; NYOKONG, T. Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 650, n. 1–3, p. 131–140, 2003.

OLSZOWSKI, P. et al. Ordering of Zn-centered porphyrin and phthalocyanine on TiO<sub>2</sub>(011): STM studies. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 99–107, 2017.

ONISZCZUK, A. et al. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 912–929, 2016.

OSSIO, R. et al. Melanoma: A global perspective. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 7, p. 393–394, 2017.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. In: **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001. v. Chapter 20p. Unit 20.1.

PARK, H.; NA, K. Conjugation of the photosensitizer Chlorin e6 to pluronic F127 for enhanced cellular internalization for photodynamic therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 28,



p. 6992–7000, 2013.

PARK, K.-M. et al. Phospholipid-based microemulsions of flurbiprofen by the spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, n. 2, p. 145–154, 1999.

PAWAR, K. R.; BABU, R. J. Lipid materials for topical and transdermal delivery of nanoemulsions. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 31, n. 5, p. 429–58, 2014.

PEREZ, D. G. et al. Phase 2 trial of carboplatin, weekly paclitaxel, and biweekly bevacizumab in patients with unresectable stage IV melanoma. **Cancer**, v. 115, n. 1, p. 119–127, 2009.

PESHKOVSKY, A. S.; BYSTRYAK, S. Continuous-flow production of a pharmaceutical nanoemulsion by high-amplitude ultrasound: Process scale-up. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 82, p. 132–136, 2014.

PETRELLA, T. et al. Single-agent interleukin-2 in the treatment of metastatic melanoma. **Current oncology**, v. 14, n. 1, p. 21–6, 2007.

PETRILLI, R. et al. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. **Journal of Controlled Release**, v. 283, p. 151–162, 2018.

PHAM, J. et al. Enhanced effectiveness of tocotrienol-based nano-emulsified system for topical delivery against skin carcinomas. **Drug Delivery**, v. 23, n. 5, p. 1–11, 2014.

PIERRE, M. B. R. et al. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: Preparation and in vitro permeation study. **BMC Dermatology**, v. 1, p. 1–6, 2001.

PRIMO, F. L. et al. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 354–357, 2007.

PRIMO, F. L. et al. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, n. 14, p. e211–e214, 2008.

PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 470–491, 2011.

RAGELLE, H. et al. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, n. 2, p. 452–459, 2012.

RAI, V. K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and

applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 203–225, 2018.

RAMREDDY, S.; KANDADI, P.; VEERABRAHMA, K. Formulation and Pharmacokinetics of Diclofenac Lipid Nanoemulsions for Parenteral Application. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 66, n. 1, p. 28–37, 2012.

RAPOZZI, V. et al. Anticancer activity of cationic porphyrins in melanoma tumour-bearing mice and mechanistic in vitro studies. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 75, p. 1–17, 2014.

REINERS JR, J. J. et al. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves bid cleavage. **Cell Death & Differentiation**, v. 9, n. 9, p. 934–944, 2002.

RHEE, Y. S. et al. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 228, n. 1–2, p. 161–70, 2001.

RIBAS, A. et al. BRIM-2: An open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with *BRAF* V600E mutation-positive metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 8509–8509, 2011.

RIBATTI, D.; ANNESE, T.; LONGO, V. Angiogenesis and Melanoma. **Cancer (Basel)**, v. 2, n. 1, p. 114–132, 2010.

RIBEIRO, A. P. D. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 2, p. 549–559, 2015.

RIZOS, H. et al. BRAF Inhibitor Resistance Mechanisms in Metastatic Melanoma: Spectrum and Clinical Impact. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 7, p. 1965–1977, 2014.

ROBERT, C. et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2517–2526, 2011.

ROBERT, C. et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 4, p. 320–330, 2015a.

ROBERT, C. et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 26, p. 2521–2532, 2015b.

ROBERTS, M. et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86–105, 2017.

RODAL, G. H. et al. Liposome-bound Zn(II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 45, n. 2–3, p. 150–159, 1998.

ROELANDTS, R. A new light on Niels Finsen, a century after his nobel prize.

**Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 115–117, 2005.

ROFSTAD, E. K.; DANIELSEN, T. Hypoxia-induced angiogenesis and vascular endothelial growth factor secretion in human melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 77, n. 6, p. 897–902, 1998.

ROSSETTI, F. C. et al. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 155, n. 3, p. 400–408, 2011.

SALVEN, P.; HEIKKILÄ, P.; JOENSUU, H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 7, p. 930–4, 1997.

SANDLER, A. et al. Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non–Small-Cell Lung Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 24, p. 2542–2550, 2006.

SAVIANO, S. et al. Combined therapy with bevacizumab and photodynamic therapy for myopic choroidal neovascularization: A one-year follow-up controlled study. **International Journal of Ophthalmology**, v. 7, n. 2, p. 335–9, 2014.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018.

SCHAFFAZICK, S. R. 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.

SCHIEWECK, K. et al. CGP 55847, liposome-delivered zinc(II)-phthalocyanine as a phototherapeutic agent for tumors. **SPIE**, v. 2078, n. li, p. 107–118, 1994.

SCOTT, E. R. et al. Transport of ionic species in skin: contribution of pores to the overall skin conductance. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 12, p. 1699–709, 1993.

SEKKAT, N. et al. Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 98–144, 2011.

SENGER, D. R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 983–5, 1983.

SERRONE, L. et al. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 19, n. 1, p. 21–34, 2000.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews. Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

SHAO, J. et al. Intracellular distribution and mechanisms of actions of photosensitizer Zinc(II)-phthalocyanine solubilized in Cremophor EL against human hepatocellular

carcinoma HepG2 cells. **Cancer Letters**, v. 330, n. 1, p. 49–56, 2013.

SHARMA, K. V.; BOWERS, N.; DAVIDS, L. M. Photodynamic therapy-induced killing is enhanced in depigmented metastatic melanoma cells. **Cell Biology International**, v. 35, n. 9, p. 939–944, 2011.

SHARMA, K. V.; DAVIDS, L. M. Depigmentation in melanomas increases the efficacy of hypericin-mediated photodynamic-induced cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 156–163, 2012.

SHEN, X. et al. Alterations in mitochondrial and apoptosis regulating gene expression in photodynamic therapy resistant variants of HT29 colon carcinoma cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 2, p. 306–13, 2004.

SHI, Y. et al. Development, optimization and evaluation of emodin loaded nanoemulsion prepared by ultrasonic emulsification. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 27, p. 46–55, 2015.

SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for Photodynamic Therapy use. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 2, p. 131–138, 2004.

SILENI, V. et al. Phase II randomized study of dacarbazine, carmustine, cisplatin and tamoxifen versus dacarbazine alone in advanced melanoma patients. **Melanoma Research**, v. 11, n. 2, p. 189–196, 2001.

SIMON, H.-U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, n. 5, p. 415-418, 2000.

SINGH, R.; HUSSEINI, G. A.; PITT, W. G. Phase transitions of nanoemulsions using ultrasound: Experimental observations. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 1120–1125, 2012.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SOARES, M. V.; OLIVEIRA, M. R.; SANTOS, E. P.; GITIRANA, L. B.; BARBOSA, G. M.; QUARESMA, C. H.; RICCI-JÚNIOR, E. Nanostructured delivery system for zinc phthalocyanine: preparation, characterization, and phototoxicity study against human lung adenocarcinoma A549 cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 227-238, 2011.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138–3151, 2003.

SOUIED, E. H. et al. Non-invasive gene transfer by iontophoresis for therapy of an inherited retinal degeneration. **Experimental Eye Research**, v. 87, n. 3, p. 168–175, 2008.

SOUZA, J. G. et al. Iontophoretic transport of zinc phthalocyanine tetrasulfonic acid as a tool to improve drug topical delivery. **Anti-Cancer Drugs**, v. 22, n. 8, p. 783–793, 2011.

STOLIK, S. et al. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 57, n. 2–3, p. 90–93, 2000.

SUN, H. et al. Development and characterization of a novel nanoemulsion drug-delivery system for potential application in oral delivery of protein drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5529–43, 2012.

TAGNE, J.-B.; KAKUMANU, S.; NICOLOSI, R. J. Nanoemulsion Preparations of the Anticancer Drug Dacarbazine Significantly Increase Its Efficacy in a Xenograft Mouse Melanoma Model. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 6, p. 1055–1063, 2008.

TAMAYO, I. et al. Topical immunization using a nanoemulsion containing bacterial membrane antigens. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 207–214, 2017.

TANG, S. Y. et al. Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 2, p. 330–345, 2012.

TAPPENIER, V.; H. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. **Muench Med Wochenschr**, v. 47, p. 2042–2044, 1903.

TAVEIRA, S. F. et al. Effect of iontophoresis on topical delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 7, p. 1382–1390, 2014.

TAYEB, H. H.; SAINSBURY, F. Nanoemulsions in drug delivery: formulation to medical application. **Nanomedicine**, v. 13, n. 19, p. 2507–2525, 2018.

TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; BELTRAME, M. Phthalocyanines: Synthesis, Characterization and Biological Applications of Photodynamic Therapy (PDT), Nanobiotechnology, Magnetohyperthermia and Photodiagnosis (Theranostics). In: **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 1–6.

TIWARI, S. B.; SHENOY, D. B.; AMIJI, M. M. Nanoemulsion Formulations for Improved Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs. **NSTI-Nanotech**, v. 1, p. 475–478, 2006.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2443–2454, 2012.

TOPALIAN, S. L. et al. Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 10, p. 1020–1030, 2014.

TOYODA, M. et al. Anti-cancer vaccination by transdermal delivery of antigen peptide-loaded nanogels via iontophoresis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 110–114, 2015.

TRACEY, E. H.; VIJ, A. Updates in Melanoma. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 1, p. 73–82, 2019.

TSENG, M. T. et al. Photodynamic therapy induced ultrastructural alterations in microvasculature of the rat cremaster muscle. **Photochemistry and Photobiology**, v. 48, n. 5, p. 675–81, 1988.

TSUJI, T. Bleomycin iontophoretic therapy for verrucous carcinoma. **Archives of Dermatology**, v. 127, n. 7, p. 973–5, 1991.

U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **ClinicalTrials.gov**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Melanoma+%28Skin%29&term=&cntry=&state=&city=&dist=>>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

UGUREL, S. et al. Increased Serum Concentration of Angiogenic Factors in Malignant Melanoma Patients Correlates With Tumor Progression and Survival. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 2, p. 577–583, 2001.

VALDUGA, G. et al. Photosensitization of cells with different metastatic potentials by liposome-delivered Zn(II)-phthalocyanine. **International Journal of Cancer**, v. 75, n. 3, p. 412–417, 1998.

VAN LEENGOED, H. et al. In vivo fluorescence and photodynamic activity of zinc phthalocyanine administered in liposomes. **British Journal of Cancer**, v. 69, n. 5, p. 840–845, 1994.

VAN STRATEN, D. et al. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. **Cancers**, v. 9, n. 12, p. 19, 2017.

VARKER, K. A. et al. A Randomized Phase 2 Trial of Bevacizumab with or without Daily Low-Dose Interferon Alfa-2b in Metastatic Malignant Melanoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 14, n. 8, p. 2367–2376, 2007.

VENTURA, S. A. et al. Cortisol extraction through human skin by reverse iontophoresis. **Bioelectrochemistry**, v. 114, p. 54–60, 2017.

VENUGANTI, V. V. K. et al. Topical gene silencing by iontophoretic delivery of an antisense oligonucleotide–dendrimer nanocomplex: the proof of concept in a skin cancer mouse model. **Nanoscale**, v. 7, n. 9, p. 3903–3914, 2015.

VOGT, A. et al. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges? **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 3–15, 2016.

VON MOOS, R. et al. First-line temozolomide combined with bevacizumab in metastatic melanoma: a multicentre phase II trial (SAKK 50/07). **Annals of Oncology**,

v. 23, n. 2, p. 531–536, 2012.

WANG, Y. et al. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 2, p. 179–191, 2005.

WANG, Z.-J. et al. Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Photodynamic Therapy Efficacy of Liposomal-Delivered Hypocrellin A, a Potential Photosensitizer for Tumor Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 5, p. 773–780, 1999.

WANGARI-TALBOT, J.; CHEN, S. Genetics of melanoma. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 1–16, 2013.

WOOD, S. R.; HOLROYD, J. A.; BROWN, S. B. The Subcellular Localization of Zn(II) Phthalocyanines and Their Redistribution on Exposure to Light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, n. 3, p. 397–402, 1997.

WU, X. et al. Disposition of Charged Nanoparticles after Their Topical Application to the Skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. 3, p. 117–123, 2010.

YANG, H.; JAGER, M. J.; GROSSNIKLAUS, H. E. Bevacizumab Suppression of Establishment of Micrometastases in Experimental Ocular Melanoma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 6, p. 2835, 2010.

YOUSSEF, T. et al. Evaluation of hypericin-loaded solid lipid nanoparticles: Physicochemical properties, photostability and phototoxicity. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 17, n. 2, p. 177–186, 2012.

YU, W. et al. Zinc phthalocyanine encapsulated in polymer micelles as a potent photosensitizer for the photodynamic therapy of osteosarcoma. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n. 4, p. 1099–1110, 2018.

ZHANG, L.-W. et al. Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 693–704, 2011.

ZHOU, C. et al. Apoptosis of mouse MS-2 fibrosarcoma cells induced by photodynamic therapy with Zn(II)-phthalocyanine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 33, n. 3, p. 219–223, 1996.

