

Anderson Matheus Pereira da Silva¹, Victoria Brito Evangelista⁴, Ilan Iginio da Silva², Victória Freitas de Sousa Vieira²,
Thamires Ferreira Mariano², José Wilson Cosme de Mesquita Júnior², Caio Samuel de Oliveira Alves²,
Vinícius Pereira da Silva², Ikaro Alves de Andrade², Kendric Mariano Damasceno Dias²,
Katherine Patricia Saraiva Iginio Oyarzún², Keyla Liana Bezerra Machado⁵, Vinícius Silveira Mendes²

RESUMO

O melanoma representa uma patologia caracterizada pela proliferação de células malignas, originárias dos melanócitos, as quais são responsáveis pela pigmentação cutânea. Esta condição acomete predominantemente indivíduos de etnia caucasiana adulta. O melanoma pode surgir em qualquer localização anatômica, tanto na pele quanto em mucosas, frequentemente se manifestando na forma de lesões pigmentadas, como manchas, pintas ou sinais. Objetivo: O presente estudo consistiu em uma revisão bibliográfica com o objetivo de embasar teoricamente o processo de encapsulação de fármacos em nanopartículas poliméricas, especialmente em relação ao tratamento do melanoma, uma vez que sua incidência tem aumentado no Brasil. Metodologia: O propósito deste estudo foi realizar uma revisão sucinta da literatura científica, com o intuito de adquirir conhecimento teórico sobre o processo de encapsulação de fármacos em nanopartículas poliméricas. Para tal, foi conduzida uma análise abrangente da literatura existente, abordando tanto o referido procedimento quanto o melanoma, cuja incidência tem crescido de forma notável no contexto brasileiro. Resultados e Discussão: A partir dessa revisão, surgiu a perspectiva de desenvolver e avaliar a eficácia de nanopartículas poliméricas contendo 5-FU encapsulado, com vistas a sua aplicação potencial no tratamento do melanoma. Conclusão Em síntese, destaca-se a importância de uma fundamentação teórica sólida para a definição precisa do escopo da investigação e para o aporte de contribuições relevantes ao conhecimento científico nesse domínio.

Palavras-chave: Neoplasia; Partículas; Poliméricas.

ABSTRACT

Melanoma represents a pathology characterized by the proliferation of malignant cells, originating from melanocytes, which are responsible for skin pigmentation. This condition predominantly affects individuals of Caucasian ethnicity in adulthood. Melanoma can arise in any anatomical location, both on the skin and mucous membranes, often manifesting in the form of pigmented lesions, such as spots, moles, or signs. Objective: The present study consisted of a literature review aiming to theoretically support the process of drug encapsulation in polymeric nanoparticles, especially regarding the treatment of melanoma, as its incidence has been increasing in Brazil. Methodology: The purpose of this study was to conduct a concise review of the scientific literature to acquire theoretical knowledge about the process of drug encapsulation in polymeric nanoparticles. To achieve this, a comprehensive analysis of the existing literature was conducted, addressing both the aforementioned procedure and melanoma, whose incidence has grown notably in the Brazilian context. Results and Discussion: From this review, the perspective of developing and evaluating the efficacy of polymeric nanoparticles containing encapsulated 5-FU emerged, with a view to their potential application in the treatment of melanoma. Conclusion: In summary, the importance of a solid theoretical foundation is emphasized for the precise definition of the scope of research and for providing relevant contributions to scientific knowledge in this domain.

Keywords: Neoplasia; Particles; Polymeric.

1 Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

2 Faculdade Anhanguera de Brasília

3 Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – (UNILAB)

4 Faculdade UNIBRAS

5 Universidade Federal do Piauí - UFPI

Autor de correspondência

Anderson Matheus Pereira da Silva

Anderson.mhps@icloud.com

INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de neoplasia cutânea reconhecido por sua agressividade, representando o câncer de pele mais letal. Embora seja menos prevalente em comparação com outros tipos de câncer de pele, o melanoma é associado a uma taxa significativa de mortalidade. A classificação dos cânceres cutâneos divide-se em melanoma e não melanoma, sendo este último menos letal. O melanoma, ao contrário, apresenta uma alta taxa de mortalidade, contribuindo para a maioria dos óbitos relacionados ao câncer de pele².

A patogênese do melanoma origina-se nos melanócitos, células localizadas na camada basal da epiderme, responsáveis pela pigmentação cutânea. Fatores genéticos e ambientais contribuem para a transformação maligna dessas células, com a exposição à radiação ultravioleta (UV) sendo o principal fator ambiental implicado. Outros fatores, como predisposição genética e características pigmentares individuais, também desempenham um papel na carcinogênese cutânea³.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o melanoma é mais comum em indivíduos de pele clara, podendo ocorrer em qualquer região do corpo, incluindo membranas mucosas. Manifesta-se frequentemente como manchas, pintas ou sinais cutâneos, podendo se disseminar para outros órgãos quando metastático. Em pessoas de pele mais escura, o melanoma tende

a ocorrer em áreas menos pigmentadas, como palmas das mãos e plantas dos pés.

O câncer de pele representa aproximadamente 27% dos tumores malignos diagnosticados no Brasil, mantendo-se como uma das neoplasias mais comuns no país e no mundo. Embora seja associado a um grande número de novos casos anualmente, o câncer de pele tem altas taxas de cura quando detectado precocemente e tratado adequadamente. No Brasil, estima-se que ocorram 88.770 novos casos em homens e 93.170 em mulheres a cada ano, no período de 2020 a 2022³.

A abordagem terapêutica convencional do melanoma inclui opções como cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia alvo, selecionadas com base no estágio e nas características individuais do tumor. No entanto, muitos pacientes enfrentam desafios na adesão ao tratamento devido a efeitos adversos e impactos psicossociais, o que pode resultar em interrupção prematura do tratamento.

Diante dessas limitações, têm sido investigadas estratégias para melhorar a eficácia terapêutica e a adesão ao tratamento, incluindo o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados. Esses sistemas oferecem diversas vantagens, como a liberação controlada de fármacos no local do tumor e a proteção contra degradação. As nanopartículas poliméricas, em particular, têm sido objeto de estudo devido à sua capacidade de encapsular fármacos, como o fluorouracil (5-FU), de forma eficaz⁶.

Nanopartículas poliméricas são sistemas de transporte de fármacos com dimensões inferiores a 1 μm , compostas por polímeros naturais ou sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis. Essas nanopartículas podem

se apresentar sob a forma de nanoesferas ou nanocápsulas, sendo as primeiras caracterizadas por uma estrutura polimérica contínua, enquanto as segundas consistem em um núcleo oleoso envolto por polímeros¹³.



Figura 1: Nanopartículas poliméricas
Fonte: Abriata (2020)

Portanto, a droga escolhida para ser encapsulada foi o fluorouracil (5-FU), que possui atividade antitumoral e apresenta uma característica hidrofílica, fazendo com que seja uma boa candidata para encapsulação visando assegurar sua entrega no local do tumor. Além disso, é um agente citotóxico amplamente utilizado na terapêutica de cânceres malignos. Seu mecanismo de ação consiste em atuar como um inibidor, interferindo no metabolismo de moléculas como os nucleosídeos, podendo ser incorporado ao RNA e DNA. Dessa forma, sua principal ação é inibir a timidilato sintase e, conseqüentemente, induzir a apoptose das células cancerosas¹⁹.

Contudo, há outras razões para a escolha de encapsular este medicamento, relacionadas às

suas limitações devido às suas características físico-químicas. Apesar de sua atividade terapêutica ser bem definida, o 5-FU possui uma meia-vida plasmática curta, o que impossibilita um efeito terapêutico sustentado. Sua biodistribuição não é seletiva, resultando em efeitos tóxicos e adversos. Além disso, há a capacidade de desenvolver resistência a outras drogas por parte das próprias células tumorais malignas⁶. Somando-se a isso, o 5-FU apresenta características que impedem sua aplicação direta sobre a pele de forma tópica, pois é irritante no tratamento de lesões cutâneas. No entanto, quando encapsulado em nanopartículas, observa-se uma redução considerável dessa irritação¹⁹.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi elaborar uma breve revisão de literatura com o intuito de adquirir embasamento teórico sobre o processo de encapsulação do fármaco em nanopartículas poliméricas. Isso foi possível mediante a revisão da literatura científica já publicada sobre este procedimento e a respeito do melanoma, que vem se tornando mais prevalente no Brasil. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foi previsto para o ano de 2020 que haveria 8.450 novos casos de melanoma cutâneo, evidenciando a importância do estudo e desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento dessa patologia e, assim, proporcionar melhores opções terapêuticas à comunidade³.

METODOLOGIA

A organização da revisão consiste na metodologia utilizada para o desenvolvimento do trabalho, seguida pelos resultados, que englobam subtópicos sobre os principais pontos presentes na pesquisa, e, por fim, a conclusão obtida após a análise de toda a literatura revisada.

Para investigar os métodos e técnicas empregados na avaliação in vitro de nanopartículas contendo 5-Fluorouracila no tratamento do melanoma, realizou-se uma revisão integrativa da literatura. O objetivo primordial foi explorar as abordagens utilizadas para avaliar a eficácia dessas nanopartículas na terapia do melanoma. Como direcionamento para a pesquisa, foi formulada

a seguinte pergunta norteadora: “Quais são os métodos e técnicas mais recentes empregados na avaliação in vitro de nanopartículas contendo 5-Fluorouracila para o tratamento do melanoma?”

Para a busca de artigos científicos, foram empregadas referências primárias e secundárias de publicações entre 2003 e 2018, obtidas por meio de plataformas renomadas como PubMed e ScienceDirect, utilizando Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): Nanopartículas, 5-Fluorouracila, Melanoma e Avaliação in vitro. Os critérios de inclusão definidos abrangeram artigos em inglês, disponíveis na íntegra e que tratavam dos métodos e técnicas de avaliação in vitro de nanopartículas contendo 5-Fluorouracila no tratamento do melanoma. Os critérios de exclusão foram aplicados para trabalhos incompletos, duplicados em mais de uma base de dados e de baixa relevância científica.

Após a seleção da amostra, composta por 8 artigos, foram analisados os métodos e técnicas empregados para avaliar a citotoxicidade, o potencial antitumoral e a penetração cutânea das nanopartículas. Uma busca adicional foi realizada no Google Acadêmico® utilizando palavras-chave relacionadas, como “avaliação in vitro de nanopartículas de 5-Fluorouracila em melanoma”, resultando em 1768 resultados. Após a triagem dos títulos e resumos, foram selecionados os estudos relevantes que atendiam aos critérios estabelecidos para elaborar o artigo.

Os artigos selecionados foram minuciosamente revisados e resumidos,

destacando os métodos e técnicas empregados na avaliação in vitro das nanopartículas, bem como os resultados obtidos. Para complementar essa revisão de literatura, foram consultados vídeos de palestrantes especializados na área, disponibilizados pelo evento I NanoBioVasf, realizado em dezembro de 2020. Tais recursos contribuíram significativamente para uma compreensão aprofundada dos métodos e técnicas utilizados na avaliação in vitro de nanopartículas contendo 5-Fluorouracila no tratamento do melanoma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o potencial antigigênico das nanopartículas contendo o agente antitumoral selecionado, é imperativo adotar métodos e técnicas específicas para alcançar os objetivos propostos. Neste tópico, serão discutidos sucintamente cada um desses métodos.

Célula de difusão vertical do tipo Franz

A célula de difusão vertical do tipo Franz é um dispositivo empregado para realizar testes in vitro com o propósito de mensurar a liberação de pomadas, cremes, medicamentos e géis em estudos de permeação cutânea. A FDA (Food and Drug Administration) recomenda o emprego de células de difusão, como a de Franz, equipada em um compartimento específico com uma membrana, para conduzir estudos in vitro da liberação de formulações tópicas e sistemas transdérmicos¹⁶. As células de difusão de Franz

são construídas a partir de materiais inertes, como teflon ou vidro.

Essencialmente, o dispositivo consiste em dois compartimentos (Figura 2), nos quais um contém o fármaco (doador) e o outro a solução na qual o fármaco é solúvel. Ambos os compartimentos são separados por uma membrana, seja natural ou sintética, para monitorar a quantidade de fármaco que penetra. Na parte inferior da célula de difusão, um tampão é inserido para simular o fluido biológico. Portanto, é recomendável utilizar um tampão com um pH semelhante ao do local de interesse. Se o fármaco atingir o compartimento receptor, isso indica uma ação sistêmica; caso contrário, é considerada uma ação tópica¹⁴.

O objetivo deste teste é avaliar os indicadores de desempenho da formulação desenvolvida. No entanto, é crucial ter um conhecimento prévio do perfil de penetração cutânea do fármaco escolhido na pele, bem como a quantidade da substância ativa na pele e o comportamento do fluxo através das camadas até a circulação sistêmica. Portanto, antes de realizar este procedimento, é necessário determinar a resistividade elétrica da pele com um multímetro. Amostras de pele de orelha de porco com uma resistividade elétrica abaixo de $35 \text{ k}\Omega/\text{cm}^2$ são consideradas danificadas e, portanto, inadequadas para continuar o experimento¹⁸.

Na montagem das células de difusão de Franz, eletrodos de Ag/AgCl são colocados nos compartimentos doador e receptor,

gerando uma corrente elétrica que auxilia na passagem do fármaco através das camadas da membrana estudada. Portanto, o teste in vitro de permeação/penetração fornece informações sobre a quantidade de fármaco que penetrou

nas camadas da pele e permite estimar o fluxo de fármaco necessário para chegar à solução receptora, que na célula de Franz simula o fluido biológico¹⁴.

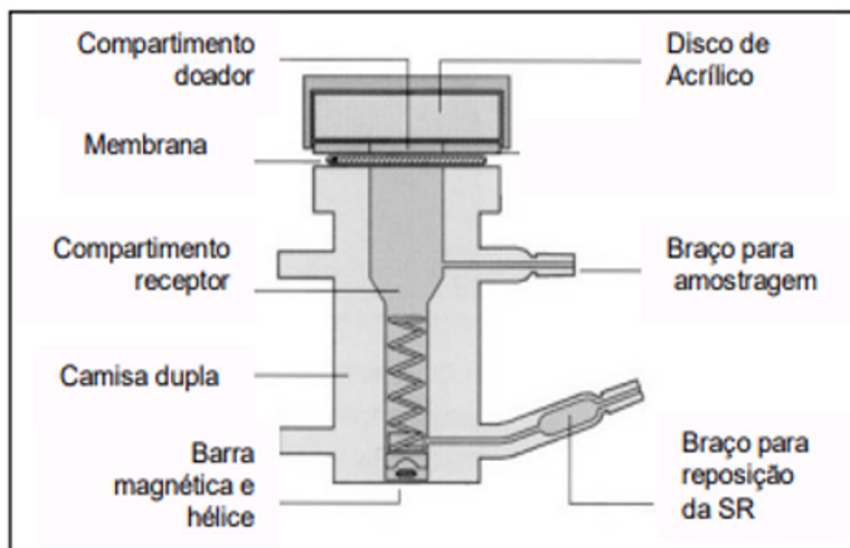


Figura 2: Célula de difusão de Franz

Fonte: Adaptação do manual da célula – Hanson Research corp

ELETRODOS DE Ag/AgCl

Conforme mencionado anteriormente, os eletrodos de prata/cloreto de prata são empregados nos compartimentos constituintes da célula de difusão de Franz devido às suas propriedades inerentes. São geralmente selecionados por sua inércia e rápida cinética, além da alta condutividade proporcionada pelo cloreto de prata, características vantajosas para esta aplicação. Outro aspecto positivo é a ausência de variação de pH, visto que a corrente elétrica aplicada opera em baixa voltagem, evitando a eletrólise da água, processo de decomposição da água mediante a aplicação de corrente elétrica e adição de eletrólito²³.

O ânodo corresponde ao eletrodo de prata (Ag), enquanto o cátodo corresponde ao eletrodo de cloreto de prata (AgCl). O funcionamento pode ser ilustrado conforme mostrado abaixo (Figura 3). O sistema mantém a neutralidade por meio do movimento de cátions do compartimento em direção à pele ou de ânions da pele em direção ao ânodo do sistema. No compartimento contendo o cátodo, ocorre sua redução na chegada do elétron, resultando no depósito de prata no eletrodo e liberação de íons cloreto na solução. Para manter a neutralidade, é necessário que cátions provenientes da pele ingressem no sistema. Portanto, a corrente elétrica alternada é aplicada, permitindo um

fluxo bidirecional contínuo de partículas sem interrupções.

Em resumo, os eletrodos de Ag e AgCl são amplamente utilizados por sua inércia, não causando alterações físicas ou químicas ao entrar em contato com o epitélio. Ao serem colocados em contato com a formulação ou

forma farmacêutica, aproveitando o princípio de que cargas opostas se atraem e cargas similares se repelem, ocorre uma força que aumenta a penetração da substância pelo epitélio. Portanto, é crucial conhecer a carga da formulação antes de aplicar a iontoforese¹⁴.

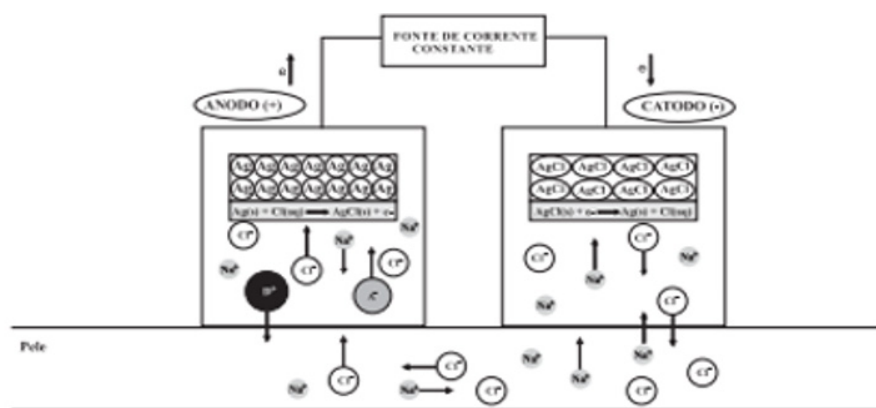


Figura 1. Iontoforese utilizando sistema de eletrodos de Ag/AgCl. O ânodo contém um fármaco ionizável D^+ e seu contra íon A^- e Na^+Cl^- . Adaptado da ref. 56

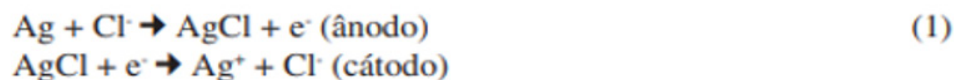


Figura 3: Sistema de eletrodos Ag/AgCl
Fonte: Gratieri; Gelfuso; Lopez (2008)

IONTOFORESE

A iontoforese é uma técnica física amplamente empregada na promoção da permeação de substâncias através da pele. Consiste em um método que utiliza corrente elétrica unidirecional, podendo ser contínua ou alternada. Para os propósitos da presente pesquisa, a corrente alternada é considerada a opção mais adequada, conforme previamente discutido. É fundamental salientar que essa corrente elétrica

é de baixa intensidade, sendo apenas o suficiente para facilitar a passagem da substância através das camadas da pele sem causar danos às células do paciente⁵.

Sua aplicação é particularmente recomendada para fármacos ionizados (carregados ou não) com aplicação tópica, potencializando assim sua liberação transdérmica através do estrato córneo, graças à eletromigração²³. Ao empregar uma corrente elétrica de baixa

intensidade, facilita-se a passagem pelo estrato córneo de fármacos encapsulados ou não, como evidenciado em testes in vitro com 5-FU. A corrente elétrica aplicada é de 0,5 mA/cm², o que é suficiente para promover a passagem desse fármaco sem causar danos. Após estudos, determinou-se que esta seria a corrente ideal para esta aplicação, principalmente em peles íntegras.

Os íons do agente ativo empregados na formulação são transportados em direção à pele por meio de repulsão contínua e movimentação do agente ativo através de caminhos como poros e possíveis pequenas passagens presentes no estrato córneo rompido. Contudo, a eficácia terapêutica desse método depende diretamente das características físico-químicas das substâncias presentes no processo.

Dessa forma, utilizando os eletrodos mencionados anteriormente, algumas observações precisam ser destacadas: ao aplicar esta técnica, a escolha da forma farmacêutica a ser estudada para a liberação iontoforética do fármaco pode ser líquida ou semissólida, desde que seja hidrofílica, permitindo sua passagem pela corrente elétrica aplicada. Nesse sentido, as soluções aquosas são mais frequentemente utilizadas, mas isso não exclui o uso de géis com características hidrofílicas. Além de serem bons condutores de corrente elétrica, esses géis podem permanecer por mais tempo no local de aplicação, o que constitui mais uma vantagem para esse tipo de formulação¹¹.

Em resumo, conforme destacado por Lemos (2018), a iontoforese é uma forma de facilitar a penetração da formulação por meio de uma fonte de energia e dois polos (+, ânodo e -, cátodo). Ela ocorre através de dois mecanismos: eletromigração e eletrosmose. Na eletromigração, o ânodo repele as moléculas, e se o fármaco apresentar uma carga positiva, ao entrar em contato com o ânodo, será gerada uma força que o repele, forçando-o a penetrar na mucosa ou pele onde está sendo aplicado. Em contrapartida, durante a eletrosmose, ocorre aumento da penetração do fármaco por meio de um fluxo de solvente e movimentação de cargas¹⁷.

TÉCNICA DE TAPE STRIPPING

De maneira geral, a técnica de tape stripping é amplamente utilizada em experimentos dermatofarmacológicos para quantificar as drogas desejadas nas camadas externas da pele, especialmente no estrato córneo, quando se destinam a uso tópico e transdérmico. Essa técnica consiste na aplicação de fita adesiva na área da pele a ser testada e, após um curto período, sua remoção. No entanto, por trás dessa aparente simplicidade, há muitos detalhes que justificam sua ampla utilização em experimentos desse tipo⁷.

É um método simples e econômico para remover as barreiras da pele. Foi em 1955 que Malkinson e Ferguson observaram que a pele funcionava como um reservatório de substâncias, incluindo substâncias químicas. Isso

demandou o desenvolvimento de métodos para investigar o conteúdo desses reservatórios e, ao mesmo tempo, suas aplicações para benefício da sociedade. A técnica permite diversas aplicações, como tornar a pele mais suscetível para induzir uma interrupção definida, avaliar o efeito de um produto aplicado e obter células para cultura micológica e/ou investigar a qualidade do estrato córneo¹⁶.

Sabe-se também que um único tape stripping não remove completamente o estrato córneo. Reconhece-se a necessidade de realizar mais de 30 a 40 desnudamentos para garantir a remoção completa do estrato córneo. As figuras 4 e 5 ilustram a aplicação da técnica e as camadas da pele.

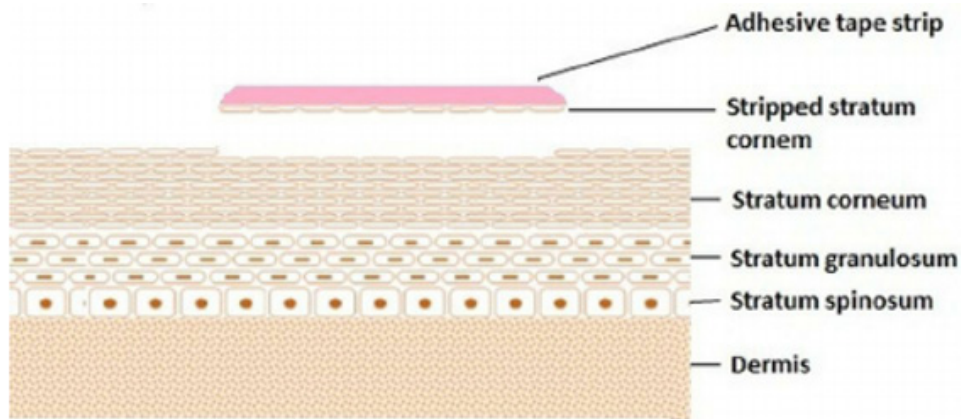


Figura 4: Remoção da fita adesiva do estrato córneo
 Fonte: Anroop Nair *et al* (2013)

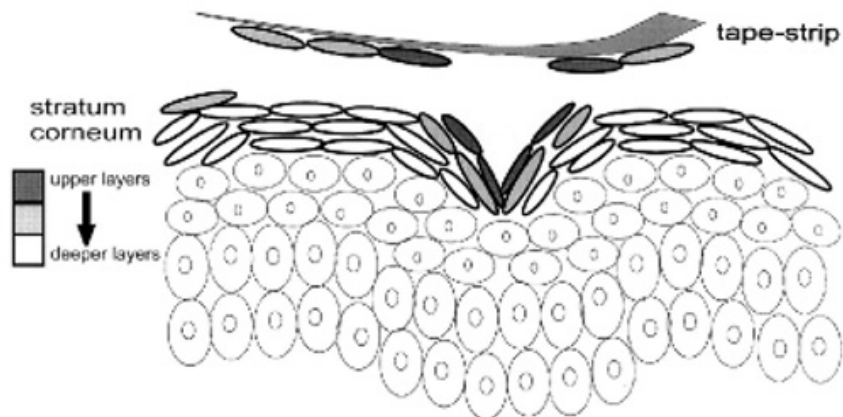


Figura 5: Remoção da fita adesiva do estrato córneo
 Fonte: Autor desconhecido

A partir das imagens obtidas, fica claro que o propósito subjacente à técnica de tape stripping é, efetivamente, remover ou separar o estrato córneo (a camada mais externa da epiderme) das camadas subjacentes da pele. Como previamente mencionado, fitas são aplicadas e removidas de forma sucessiva até que o estrato córneo seja completamente extraído, juntamente com quaisquer fármacos nele contidos. Posteriormente, através da aplicação de solventes específicos, é possível quantificar o fármaco presente tanto no estrato córneo quanto em outras camadas da epiderme⁷.

Normalmente, a pele íntegra consiste em aproximadamente 15 camadas de corneócitos. Em estudos de penetração em diferentes camadas da pele utilizando a técnica de tape stripping, recomenda-se a aplicação de 15 fitas para remover a camada superficial da pele, permitindo, assim, a avaliação da quantidade de fármaco retida no estrato córneo. A pele restante, utilizada na célula de Franz, é fragmentada e suas substâncias extraídas com um solvente para posterior quantificação⁵.

ESTRATO CÓRNEO

Como enfatizado anteriormente, é crucial discutir o papel do estrato córneo. Este constitui a camada mais externa da pele, sendo metabolicamente ativo e desempenhando um papel crucial na função de barreira cutânea¹⁸. Na Figura 6, são ilustradas as quatro camadas superficiais da pele: estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal. O estrato córneo é composto por células achatadas e anucleadas, conhecidas como corneócitos. Além de sua função como barreira cutânea, o estrato córneo é responsável por manter a hidratação do organismo, mesmo em condições climáticas adversas, e por evitar a absorção de substâncias tóxicas¹⁸.

No entanto, é precisamente devido a essa característica protetora do estrato córneo que os fármacos administrados por via tópica devem ser capazes de atravessá-lo. Para isso, é necessário que o fármaco possua um coeficiente apropriado de lipofilicidade/hidrofilicidade e baixa massa molecular¹⁸.

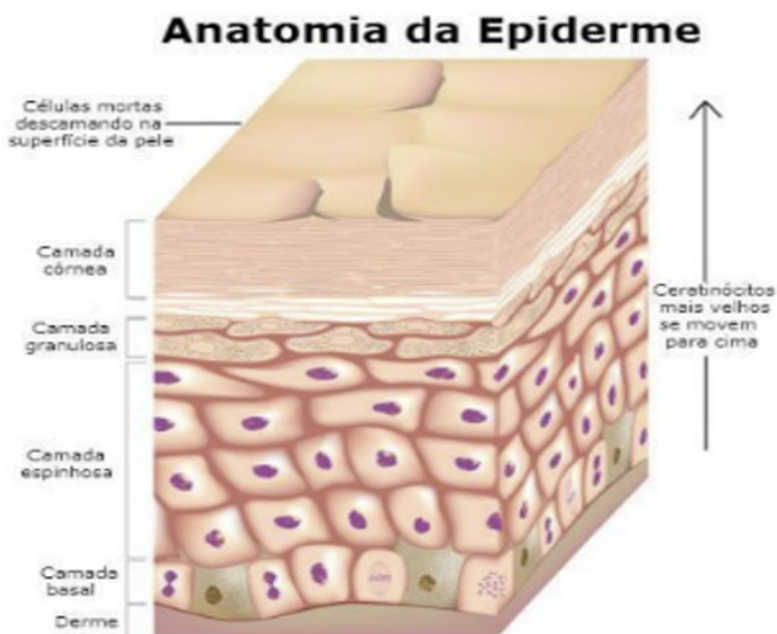


Figura 6: camadas da epiderme
Fonte: Alila/123RF, 2019

PELE SUÍNA

Nos estudos de penetração cutânea, a utilização da pele humana seria mais interessante, contudo, deparamo-nos com diversas desvantagens nesse sentido, incluindo a necessidade de aprovação legal para o uso de membranas humanas, dada a vasta variabilidade entre indivíduos, o que poderia prejudicar a replicabilidade da pesquisa. No entanto, outras membranas naturais podem ser empregadas em estudos de penetração cutânea, e uma delas é a pele suína.

É importante notar que as características da pele dos animais diferem da pele humana, sendo mais permeáveis devido às diferenças na espessura e composição do estrato córneo. Ainda assim, algumas dessas membranas podem ser utilizadas em estudos, sendo a escolha da espécie e do local anatômico dependente dos objetivos da pesquisa. Neste caso, optou-se pela pele suína devido à sua semelhança com a pele humana, à facilidade de obtenção em grande quantidade e à aprovação pelo comitê de ética.

A escolha da pele de porco ou de mini porco é relevante devido às características histológicas, bioquímicas e à densidade de folículos

pilosos semelhantes à pele humana²². Destaca-se, especialmente, a capacidade dos folículos permanecerem intactos mesmo após a excisão, o que não é observado na pele humana devido à contração dos folículos. Na pele suína, há um controle do tamanho dos folículos, mantendo-os intactos graças à presença de cartilagem¹⁴. Um estudo comparativo de permeabilidade de membrana entre a pele de porco, a pele humana e duas outras espécies animais concluiu que a pele de porco foi a que mais se assemelhou à pele humana.

Portanto, após a retirada das orelhas de porco, é importante obtê-las imediatamente após a remoção da cabeça do animal e antes de qualquer processo de escaldagem. As orelhas devem ser transportadas em um recipiente adequado até o local dos experimentos e passar por um processo de dermatomização, no qual a pele é removida com a ajuda de um dermatótomo. Em seguida, a pele deve ser armazenada em freezer a -4°C , com um tempo máximo de estocagem de 30 dias, podendo ser descongelada a qualquer momento para realização de estudos²². O processo está descrito na Figura 7.



Figura 7: Processo de dermatomização de pele de orelha de porco
Fonte: Serikaku (2006)

EFEITO EPR E TAMANHO DA NANOPARTÍCULAS

O Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada (EPR) é um fenômeno crucial observado em tumores. É desencadeado pela angiogênese desregulada, característica da vasculatura tumoral, resultando em uma rápida e desordenada formação de vasos sanguíneos para suprir as necessidades nutricionais do tumor¹. Essa rápida expansão vascular, no entanto, não permite uma organização adequada, resultando em fenestrações maiores do que as lacunas intercelulares normais¹.

É nesse contexto que os nanossistemas entram em cena. Devido às peculiaridades do sistema vascular tumoral, que apresenta defeitos estruturais e redução na drenagem linfática, os nanossistemas têm maior probabilidade de penetrar no espaço extravascular do tumor e se acumular nesse local por períodos prolongados¹³. Essa acumulação prolongada no sítio tumoral possibilita uma ação terapêutica mais eficaz ao longo do tempo.

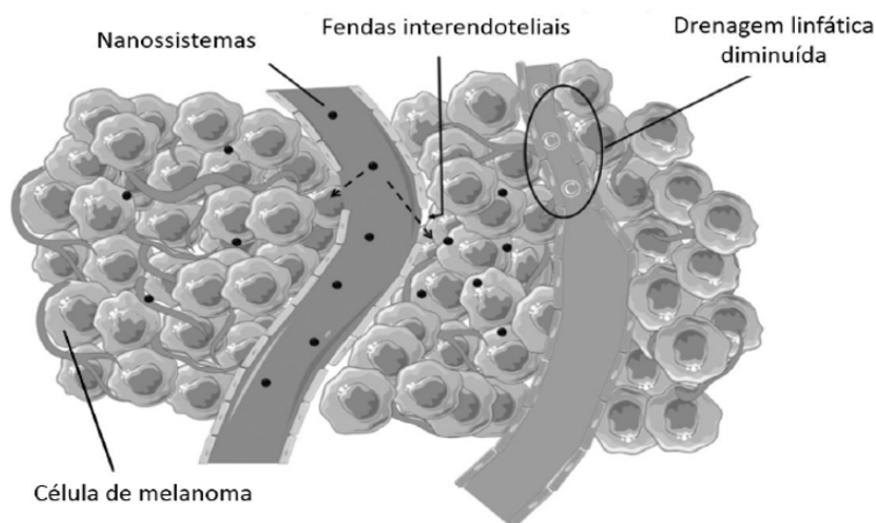


Figura 8: Esquema do efeito EPR
Fonte: Labaredas (2017)

Desta forma, é fundamental assegurar que o tamanho das partículas (nanossistemas) seja inferior a 200 nm; esse dimensionamento é crucial para garantir a eficácia da formulação, conforme discutido anteriormente em relação à sua permanência e capacidade de penetração no tumor. Este tamanho crítico permite o acúmulo da nanopartícula no tecido tumoral, facilitando sua permeação. Tal fenômeno é atribuído ao

efeito EPR, aliado à disfunção na drenagem linfática, a qual impede a captação das partículas, promovendo sua retenção prolongada no local do tumor. Dessa forma, o fármaco é liberado gradualmente, exercendo sua ação na redução do tumor, caracterizando o que é conhecido como direcionamento passivo¹.

Segundo Labaredas (2017), para que um nanossistema seja eficaz, é imprescindível

que permaneça circulando por um período prolongado, garantindo a liberação contínua do fármaco e a manutenção de altas concentrações de nanossistemas encapsulados, em quantidade suficiente para atingir o tumor. Uma vantagem desse sistema é a dispensa da necessidade de altas doses de fármaco, uma vez que a concentração elevada de fármaco encapsulado atua de forma localizada no tumor, por meio de um direcionamento passivo facilitado pelo efeito EPR.

Por isso, é essencial que os nanossistemas propostos possuam três propriedades distintas: em primeiro lugar, seu tamanho deve situar-se entre 10 e 100 nm, permitindo a penetração seletiva na vasculatura da massa tumoral, sem afetar os vasos sanguíneos das células normais; em segundo lugar, sua carga deve ser neutra ou aniônica; por fim, é crucial evitar o sistema reticuloendotelial para evitar a eliminação, exigindo, portanto, um tamanho inferior a 200 nm para evitar o sequestro por este sistema¹³.

Os nanossistemas surgiram da necessidade de proporcionar uma terapia mais eficaz sem causar danos às células saudáveis, e com a crescente identificação de moléculas-alvo, principalmente na terapia do melanoma, houve um estímulo para o desenvolvimento de nanomedicinas, oferecendo alternativas seguras e eficazes para o tratamento dos pacientes.

O objetivo primordial dos nanossistemas é promover uma alta concentração do fármaco, neste caso, o antimelanoma, na massa tumoral

por um período prolongado. Para alcançar este objetivo, é necessário que permaneçam circulando por um tempo prolongado na corrente sanguínea. Para isso, são adicionadas à superfície dos nanossistemas algumas moléculas como polímeros, anticorpos e peptídeos, que são reconhecidas pelo alvo, permitindo sua expressão eficiente para as células cancerígenas e, ao mesmo tempo, evitando a eliminação pelo sistema imunológico, proporcionando um tratamento prolongado e eficaz.

Numerosos estudos estão sendo conduzidos para aprimorar os nanossistemas, como a modificação da superfície com polímeros para evitar o reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear, como no caso das nanopartículas poliméricas; pode-se adicionar polietilenoglicol (PEG), um polímero hidrofílico, para esse fim. No entanto, antes de selecionar o polímero a ser aplicado no nanossistema, é necessário considerar se ele será reconhecido pelo organismo sem causar danos às células. O PEG, devido à presença de longas cadeias poliméricas em sua estrutura, é capaz de evitar a fagocitose e a opsonização, por meio do impedimento estérico.

Com a tecnologia atualmente disponível, é possível desenvolver diversos tipos de nanossistemas para diversas finalidades, dependendo da situação desejada. Em termos de terapia do câncer, houve o desenvolvimento de nanossistemas com o objetivo de maximizar a atividade anticancerígena sem aumentar a dose do fármaco e evitando os efeitos indesejáveis causados

por eles⁵. Entre esses nanossistemas, podem-se incluir os lipossomas, nanopartículas lipídicas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, micelas e nanopartículas metálicas

e magnéticas¹³. No entanto, os mais relevantes são os lipossomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanopartículas lipídicas e micelas (Figura 9).

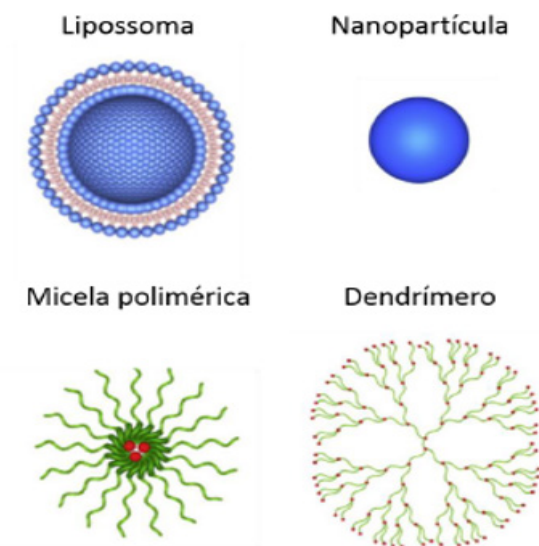


Figura 9: Nanossistemas mencionados anteriormente
Fonte: Labaredas (2017)

POTENCIAIS E MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

De acordo com a definição de polímero proposta por Manrich (2005), um polímero é definido como “qualquer material orgânico ou inorgânico, sintético ou natural, caracterizado por um alto peso molecular e pela repetição de estruturas, sendo que geralmente essas unidades repetitivas possuem baixo peso molecular”. Em essência, os polímeros são macromoléculas compostas por unidades estruturais que se repetem ao longo da cadeia. A formação de um polímero requer ligações covalentes entre essas

unidades, com os monômeros servindo como blocos de construção fundamentais. Embora uma variedade de polímeros, tanto sintéticos quanto naturais, existam, apenas aqueles reconhecidos e facilmente removidos pelo organismo humano são adequados para revestir a superfície de nanopartículas usadas em terapias médicas.

A aplicação desses polímeros na formação de nanopartículas poliméricas apresenta várias vantagens. Elas incluem o aumento da eficácia terapêutica, a redução dos efeitos colaterais associados à administração direta do fármaco, a liberação controlada do fármaco no local do

tumor, a diminuição da dose e da frequência de administração, e a proteção do fármaco contra a degradação. Essas nanopartículas, recobertas por polímeros, são geralmente menores que 1000 nm, inertes, biocompatíveis e podem ser compostas por polímeros naturais, sintéticos, biodegradáveis ou não¹. A biodegradabilidade e biocompatibilidade dos polímeros sintéticos referem-se à capacidade desses materiais de se degradarem em monômeros não tóxicos de baixo peso molecular após a liberação do fármaco. Embora possa haver reabsorção pelo organismo em alguns casos, raramente isso leva a reações adversas¹. Portanto, as nanopartículas poliméricas ganham destaque devido a essas características, especialmente por sua capacidade de encapsular fármacos, melhorando a adesão do paciente ao tratamento.

A composição das nanopartículas poliméricas inclui polímeros, solventes, tensoativos e água ou solução tampão. Os polímeros mais comumente utilizados incluem polilático (PLA), poliacrilato e poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) entre os sintéticos, e alginato, albumina e quitosana entre os naturais⁴. Além do papel do polímero, o solvente atua como agente dispersor do fármaco, enquanto o tensoativo proporciona estabilidade ao sistema, garantindo uma adequada vida útil do produto. A água ou solução tampão, preferencialmente com pH 7.4 para garantir um ambiente fisiológico, facilita a administração em estudos in vivo.

MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO 5-FU EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Ao final dos experimentos in vitro de penetração e permeação do fluorouracil, é necessário quantificar o 5-FU para determinar a quantidade do medicamento contido nas nanopartículas poliméricas e observar sua liberação. Isso permite avaliar a eficiência da encapsulação do 5-FU nessas nanopartículas. Após a penetração do fármaco nas camadas da pele na célula de difusão de Franz, a pele é picotada e os solventes apropriados são utilizados para a extração, seguida pela análise utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com coluna cromatográfica RP-C¹⁸. Embora existam vários métodos disponíveis para essa finalidade, poucos utilizam o HPLC, e os estudos que o utilizam frequentemente não fornecem informações detalhadas sobre o tempo de retenção e os picos encontrados. Por isso, alguns autores desenvolveram e validaram métodos rápidos e simples de HPLC que fornecem todas as informações necessárias¹⁵.

A escolha adequada da fase móvel, ou seja, do solvente, é fundamental para garantir a resolução adequada dos picos e o fator de retenção do 5-FU. Após a extração da pele e a preparação das amostras, estas são injetadas no sistema de HPLC para análise. Os parâmetros avaliados incluem especificidade, linearidade, alcance, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e robustez.

É importante mencionar que, após o processo de extração da pele com água, uma extração líquido-líquido com um solvente orgânico e água é realizada para reduzir interferências durante a quantificação, garantindo uma análise precisa. Em conclusão, a quantificação do 5-FU em nanopartículas poliméricas é crucial para avaliar a eficácia desses sistemas de liberação de medicamentos¹⁹.

CONCLUSÃO

Após uma análise abrangente da literatura científica pertinente, constatou-se que, apesar dos consideráveis avanços tecnológicos e do amplo escopo de pesquisas dedicadas, persiste uma lacuna significativa na oferta de alternativas terapêuticas eficazes e bem toleradas pelos pacientes, sobretudo aqueles acometidos pelo melanoma, um tipo de câncer de pele notoriamente desafiador.

Torna-se premente, portanto, intensificar os investimentos em campanhas educativas voltadas para a conscientização sobre a indispensabilidade do emprego de filtros solares e vestimentas concebidas para bloquear os raios UV/UVA. Este é um aspecto particularmente crucial em regiões como o Brasil, onde a exposição solar é intensa e a predominância de uma população envolvida em atividades agrícolas aumenta a vulnerabilidade a esses efeitos adversos. O desconhecimento generalizado das ramificações negativas dessa exposição

prolongada realça a importância de um enfoque preventivo, em que se reconheça que a prevenção assume papel central, uma vez que a intervenção apenas no estágio avançado da doença não é suficiente para mitigar seus impactos.

Nesse contexto, despontam as nanopartículas poliméricas como uma vertente promissora para a terapêutica do melanoma. Essa abordagem oferece uma modalidade terapêutica tópica, minimamente invasiva e eficaz, constituindo-se em um elemento catalisador para a adesão ao tratamento. A administração direcionada dessas nanopartículas não apenas oferece um meio de tratamento mais palatável para os pacientes, mas também pode potencialmente prevenir a necessidade de abordagens terapêuticas mais invasivas, as quais frequentemente enfrentam barreiras de adesão por parte dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Abriata JP, Montañez VV, Sarmiento E, Elizalde MC, Damonte EB, Gregurek D, et al. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2019 Mar;96:347-55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.035>.
2. Brasil. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Câncer de pele: saiba como prevenir, diagnosticar e tratar. 2020. Available from: <https://www.inca.gov.br/noticias/cancer-de-pele-saiba-como-prevenir-diagnosticar-e-tratar>. Acessado em: 2020 dez 23.
3. Brasil. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Tipos de câncer: câncer de pele melanoma. Câncer de pele melanoma. 2020. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma#:~:text=O%20c%3%A2ncer%20de%20pele%20melanoma,de%20manchas%20C%20pintas%20ou%20sinais>. Acessado em: 2020 dez 2018.
4. Calderini A. Preparação e caracterização de nano-esferas de PLGA contendo 5-fluorouracil e estudo do acoplamento de quitosana e ácido fólico em sua superfície. [thesis].

- Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2011. Available from: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/250353>. Acessado em: 20 Nov 2020.
5. Dalmolin LF, Lopez RFV. Nanoemulsion as a platform for iontophoretic delivery of lipophilic drugs in skin tumors. *Pharmaceutics* [Internet]. 2018;10(4):214. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/10/4/214>. Acessado em: 8 Dez 2020.
6. El-Hammadi MM, Arias JL, Aguirre-Cruz G, Cruz-Angeles J, Martínez-Sánchez S, Pérez-García G, et al. Folic acid-decorated and PEGylated PLGA nanoparticles for improving the antitumour activity of 5-fluorouracil. *Int J Pharm* [Internet]. 2017 Jan;516(1-2):61-70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.012>.
7. Escobar-Chavez JJ, Merino-Sanjuán V, López-Cervantes M, Urban-Morlan Z, Piñón-Segundo E, Quintanar-Guerrero D, et al. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *J Pharm Pharm Sci* [Internet]. 2008 Mar 26;11(1):104-30. Available from: <http://dx.doi.org/10.18433/j3201z>.
8. Gabriel EA, Montevilla FM, Chida VV, Dias FN, Montoya CV, Otsubo H, et al. Experimental research with synthetic copolymer coated cardiopulmonary bypass circuits: inflammatory and thrombogenicity analysis. *Artif Organs* [Internet]. 2012;36(1):110-4. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1525-1594.2011.01291.x/pdf>.
9. GBM. O melanoma: informações gerais sobre o melanoma. Grupo Brasileiro de Melanoma. Available from: <https://gbm.org.br/o-melanoma/>. Acessado em: 12 dez 2020.
10. Gomara FL. Estudo de permeação cutânea in vitro do ácido fólico. [master's thesis]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2003. Available from: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/32275>. Acessado em: 11 Nov 2020.
11. Gratieri T, Gelfuso GM, Lopez RFV. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quim Nova* [Internet]. 2008;31(6):1490-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000600040>.
12. Hajialyani M, Tewari D, Sobarzo-Sánchez E, Nabavi SM, Farzaei MH, Abdollahi M. Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes: therapeutic targets and drug delivery systems. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2018 Sep;13:5023-43. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s174072>.
13. Labaredas AS. Nanomedicina: aplicação de nanossistemas na terapêutica do melanoma. [master's thesis]. Faro: Universidade do Algarve; 2017. Available from: <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/10591/1/Monografia-Andreia-Labaredas%20Assinada.pdf>. Acessado em: 17 Dez 2020.
14. Lemos CN, de Almeida EB, de Sousa VP. Iontophoresis-stimulated silk fibroin films as a peptide delivery system for wound healing. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2018 Jul;128:147-55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.04.019>.
15. Mattos AC, Khalil NM, Mainardes RM. Development and validation of an HPLC method for the determination of fluorouracil in polymeric nanoparticles. *Braz J Pharm Sci* [Internet]. 2013 Mar;49(1):117-26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502013000100013>.
16. Nair A, Jacob S, Al-Dhubiab B, Attimarad M, Harsha S. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Braz J Pharm Sci* [Internet]. 2013 Sep;49(3):423-34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502013000300004>.
17. Oliveira A. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA PARA IONTOFORESE. 2005. Available from: https://www.researchgate.net/publication/237114287_FUNDAMENTAÇÃO_TEÓRICA_PARA_IONTOFORESE. Acessado em: 12 Set 2020.
18. Petrilli R. Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele. [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2016. Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-03052017-160905/>. Acessado em: 20 Nov 2020.
19. Petrilli R, Lopes LB, Campos PM, Fonseca MJ. Quantification of 5-FU in skin samples for the development of new delivery systems for topical cancer treatment. *Repos Inst Unesp* [Internet]. 2018 Mar;3:133-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2018.7138>.
20. Reus M. Desenvolvimento e avaliação biofarmacêutica de sistemas coloidais como carreadoras para a administração ocular do agente antitumoral 5-fluorouracil [master's thesis]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2006. Available from: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/88281?locale-attribute=es>. Acessado em: 20 Nov 2020.
21. Rigon RB. Nanopartículas lipídicas sólidas para incorporação do trans-resveratrol no tratamento tópico do melanoma: avaliação in vitro e in vivo e elucidação dos mecanismos de internalização celular. [thesis]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2017. Available from: <http://hdl.handle.net/11449/151480>. Acessado em: 10 Dez 2020.
22. Serikaku D. Avaliação in vitro da liberação, penetração e retenção cutâneas de ciclopirox olamina em formulações de uso tópico. [master's thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006. Available from: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-05122017-142258/pt-br.php>. Acessado em: 14 Set 2020.
23. Vianna DR, Pezzini M, Santana MH. Electroporation and iontophoretic for drug delivery across the skin. *Rev Virtual Quím* [Internet]. 2010 Jan;2(4):271-279. Available from: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20100025>.

Observação: os/(as) autores/(as) declaram não existir conflitos de interesses de qualquer natureza.