



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

JOABE LIMA ARAÚJO

**HIDROGEL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZANTE  
CLOROFILA A, PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA FRENTE AO  
CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA**

Brasília – DF

2022

JOABE LIMA ARAÚJO

**HIDROGEL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZANTE  
CLOROFILA A, PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA FRENTE AO  
CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo**

Brasília – DF

2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AA663h Araújo, Joabe Lima  
HIDROGEL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DO  
FOTOSSENSIBILIZANTE CLOROFILA A, PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA  
FOTODINÂMICA FRENTE AO CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA /  
Joabe Lima Araújo; orientador Ricardo Bentes de Azevedo. --  
Brasília, 2022.  
61 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Nanociência e  
Nanobiotecnologia) -- Universidade de Brasília, 2022.

1. Hidrogel. 2. Sistema termossensível. 3. Terapia  
fotodinâmica. 4. Entrega controlada de fármaco. 5.  
Melanoma.. I. de Azevedo, Ricardo Bentes, orient. II. Título.

JOABE LIMA ARAÚJO

**HIDROGEL COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZANTE  
CLOROFILA A, PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA FRENTE AO  
CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

**Membros Componentes da Banca Examinadora:**

---

**Orientador:** **Prof. Ricardo Bentes Azevedo, Dr.**  
Universidade de Brasília, UnB.

---

**Membro Interno:** **Prof. Luís Alexandre Muehlmann, Dr.**  
Universidade de Brasília, UnB.

---

**Membro Externo:** **Profa. Patrícia Bento da Silva, Dr<sup>a</sup>.**  
Universidade Estadual Paulista Júlio de  
Mesquita Filho, UNESP.

---

**Membro Interno (Suplente):** **Prof. João Paulo Longo, Dr.**  
Universidade de Brasília, UnB.

**Local: Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
UnB – Campus Darcy Ribeiro

*Dedico este trabalho a minha família, que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis, assim como, à minha amada avó, Romana Soares Pereira, em sua memória.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu amado Deus, por me conceder o dom da vida, a sabedoria e por proteger-me nessa árdua caminhada.

A minha querida família que muito contribuiu para este momento, em especial aos meus pais, Joel Araújo e Rosilene Araújo, aos meus irmãos, Jessé Araújo e Ingridyde Araújo, e a minha querida tia Lucirene Pereira, por suas contribuições no decorrer dessa minha trajetória acadêmica.

Também agradeço a minha tia Me. Liene Pereira, por sempre estar à disposição em me ajudar quando eu mais precisei. Além disso, és um exemplo para mim e toda minha família.

Aos meus amigos e amigas que estiveram comigo nos melhores e piores momentos no decorrer dessa caminhada, em especial, Matheus Aires, Vinícius Coelho, Victor Alves, Me. Lucas Aires, Me. Mayla Santos, Me. Cristiele Souza, Dr. Welinton Gimarez e Dr. Wállef Silva, meu muito obrigado a todos vocês por fazerem parte de momentos difíceis e felizes durante minha trajetória nesse mestrado.

Não poderia deixar de agradecer ao Prof. Dr. Marlus Chorilli e o Prof. Dr. Bruno Fonseca-Santos, pelas medidas de bioadesão e reologia dos hidrogeis. Além do Prof. Dr. Paulo Souza, pela confecção do LED, sem ele, não teríamos o protótipo para realizar os experimentos de TFD *in vitro*. E ao Prof. Dr. Sebastião Silva, pela liberação do uso do equipamento de FTIR. E a Profa. Dra. Sônia Baó, por realizar a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das amostras.

Aos meus colegas de laboratório, Me. Amanda Alencar, Me. Henrique Araújo, Isadora Florêncio e Me. Julia Vieira, pelos treinamentos na sala de cultivo celular. Todos eles me proporcionaram uma experiência fantástica dentro da sala de cultivo e contribuíram de forma significativa na minha formação.

Também agradeço a minha mentora e amiga, Dr<sup>a</sup>. Patrícia Silva, que desde o início deste projeto esteve ao meu lado compartilhando seus ensinamentos e suas generosas palavras de apoio. Além disso, tornou-se uma inspiração para mim, pois és uma pessoa extra-ordinária e que sempre estará no meu coração.

Também desejo agradecer a Julia Vieira, uma amiga que Brasília me deu! Sempre esteve a disposição para me ajudar e auxiliar no que eu precisasse. Tornou-se uma pessoa especial e jamais irei esquecê-la.

Estendo também os agradecimentos ao meu colega de laboratório, Me. Alan Kelbis, que se tornou uma pessoa especial para mim, contribuiu tanto em sugestões da escrita desta dissertação como em momentos de lazer nas quadras de vôlei de Brasília.

Aos irmãos da ICE de Brasília, pelo acolhimento quando os visitei, onde sinto-me em casa quando estou com eles.

A minha amada noiva, Gardênia Santos, que sempre esteve comigo nos momentos difíceis e motivou-me a nunca desistir, dando-me ânimo e restaurando minhas energias.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Ricardo Azevedo, que se tornou uma inspiração tanto como pessoa, quanto como profissional, em que se torna referência em minha continuidade no meio acadêmico. Além de ser grato pelos seus ensinamentos e por confiar a mim o desenvolvimento deste projeto.

Também agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo e ao Decanato de Pós-Graduação (DPG) pelo apoio financeiro.

Enfim, todos aqueles que contribuíram para o meu sucesso. Meu muito obrigado!

“Seu melhor investimento é você mesmo. Não há nada que se compare a isso”.

Warren Buffett (2013).

## RESUMO

O melanoma maligno é o tipo mais agressivo de câncer de pele, no qual fatores genéticos e ambientais estão intimamente envolvidos em seu desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê incidência média de 100 mil novos casos por ano em todo o mundo até o ano de 2040. Isso mostra os desafios que órgãos governamentais enfrentarão ao longo desses anos, exigindo novas estratégias de tratamento com maior eficácia e com menos efeitos colaterais. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade anticancerígena do fotossensibilizante (FS) Clorofila a (Chl<sub>a</sub>, em inglês) incorporada a hidrogéis (HGs) à base de quitosana (QS) e poloxamer 407 (P407) aplicado na Terapia Fotodinâmica (TFD) *in vitro* frente à linhagem celular de melanoma murino B16-F10. A formulação de HG baseado em QS e P407 contendo Chl<sub>a</sub> foi avaliada por meio de estudos reológicos, tais como: temperatura da fase de transição sol-gel ( $T_{\text{sol-gel}}$ ), tempo da fase de  $T_{\text{sol-gel}}$ , viscosidade e bioadesão. Também foram realizados estudos de caracterização morfológica através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e estudos por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, em inglês) para identificar interações de grupos funcionais dos polímeros utilizados e qualquer outro composto contaminante. Além disso, a atividade fotodinâmica do HG contendo Chl<sub>a</sub> foi avaliada por meio da TFD *in vitro*. O HG à base de QS e P407 mostrou-se eficaz na liberação do FS Chl<sub>a</sub>. Além disso, apresentou características essenciais para aplicações tópicas, como a temperatura de 34,46 °C da fase de  $T_{\text{sol-gel}}$ , tempo de 10,20 s da fase de  $T_{\text{sol-gel}}$  e força de deslocamento de 50 mN. Todas essas propriedades favoreceram a biodisponibilidade do fármaco, liberação do princípio ativo e aumento do tempo de permanência do FS no local aplicado devido à sua baixa fluidez. Como também, proporcionou efetividade da TFD *in vitro* em que o FS apresentou alta atividade fotodinâmica com um IC<sub>50</sub> de 25,99 µM, uma redução significativa da viabilidade celular das células de melanoma em comparação ao IC<sub>50</sub> de 173,8 µM da Cisplatina (CDDP). Portanto, foi possível evidenciar a efetividade da formulação de um HG à base de QS e P407 como sistema termossensível em aplicações tópicas para a liberação do FS Chl<sub>a</sub> em TFD contra melanoma. Permitindo inferir, que este sistema termossensível de aplicação tópica também proporciona uma liberação sustentada de fármacos, necessitando-se de estudos que confirmem essa evidência.

**Palavras-chave:** Hidrogel; sistema termossensível; terapia fotodinâmica; entrega controlada de fármaco; melanoma.

## ABSTRACT

Malignant melanoma is the most aggressive type of skin cancer, in which genetic and environmental factors are closely involved in its development. The World Health Organization (WHO), predict an average increase of 100,000 new cases worldwide by the year 2040. This shows the challenges that government agencies will face over these years, requiring new treatment strategies with greater effectiveness and with fewer side effects. Thus, this study aimed to evaluate the anticancer activity of the photosensitizer (PS) Chlorophyll a (Chl a) incorporated into hydrogels (HGs) based on chitosan (CS) and poloxamer 407 (P407) using Photodynamic Therapy (PDT) against the murine melanoma cell line B16-F10. The formulation of HG based on CS and P407 containing Chl a was evaluated through rheological studies, such as: sol-gel ( $T_{\text{sol-gel}}$ ) transition phase temperature,  $T_{\text{sol-gel}}$  phase time, viscosity and bioadhesion. Morphological characterization studies were also carried out by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) studies to identify interactions at the level of functional groups of the polymers used and to identify any contaminating compound. In addition, the photodynamic activity of HG containing Chl a was evaluated by *in vitro* PDT. The HG based on QS and P407 proved to be effective in releasing PS Chl a. In addition, it presented essential characteristics for topical applications, such as a temperature of 34,46 °C in the  $T_{\text{sol-gel}}$  phase, a time of 10.20 s in the  $T_{\text{sol-gel}}$  phase and a displacement force of 50 mN. All these properties favored the bioavailability of the drug, controlled release of the active ingredient and an increase in the permanence time of the PS at the applied site due to its low fluidity. It also provided effectiveness *in vitro* PDT in which PS showed high photodynamic activity with an  $IC_{50}$  of 25.99  $\mu\text{M}$ , a significant reduction in the cell viability of melanoma cells compared to the  $IC_{50}$  of 173.8  $\mu\text{M}$  of Cisplatin (CDDP). Therefore, it was possible to evidence the effectiveness of the formulation of a HG based on QS and P407 as a thermosensitive system in topical applications for the release of PS Chl a in PDT against melanoma. Allowing us to infer that this thermosensitive system of topical application also provides a controlled release of drugs, requiring further studies to confirm this evidence.

**Keywords:** Hydrogel; thermosensitive system; photodynamic therapy; controlled drug delivery; melanoma.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática da proliferação de células melanocíticas.....	18
<b>Figura 2</b>	Número de casos de câncer de pele do tipo melanoma no ano de 2020 e estimativa de novos casos de 2020 a 2040, ambos os sexos, idade [0-85 +].....	20
<b>Figura 3</b>	Taxa de incidência Mundial de melanoma cutâneo no ano de 2020, padronizada por idade em ambos os sexos.....	21
<b>Figura 4</b>	Mecanismo de funcionamento da TFD.....	26
<b>Figura 5</b>	Estrutura química da clorofila a (Chl_a).....	28
<b>Figura 6</b>	Estrutura química da quitosana (QS).....	29
<b>Figura 7</b>	Estrutura química do poloxamer 407 (P407).....	30
<b>Figura 8</b>	Viscosidade das amostras de HGs em função da temperatura.....	40
<b>Figura 9</b>	Gráfico de barras da força de destacamento exibidas pelas amostras.....	42
<b>Figura 10</b>	Espectro vibracional na região do infravermelho ( $400-4000\text{ cm}^{-1}$ ) do poloxamer 407, quitosana, mistura física e hidrogel.....	44
<b>Figura 11</b>	Morfologia de superfície do hidrogel à base de quitosana e poloxamer 407.....	46
<b>Figura 12</b>	Atividade citotóxica de soluções de etanol e HGs-livre frente células de melanoma.....	47
<b>Figura 13</b>	Atividade citotóxica de HGs contendo Chl_a e soluções de Chl_a frente células de melanoma.....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Lista de materiais.....	33
<b>Tabela 2</b>	Lista de reagentes.....	33
<b>Tabela 3</b>	Composições e concentrações das formulações dos hidrogeis.....	34
<b>Tabela 4</b>	Dados de <i>on set</i> da temperatura de $T_{\text{sol-gel}}$ dos hidrogeis.....	40
<b>Tabela 5</b>	Tempo da fase de $T_{\text{sol-gel}}$ dos HG-QS-P407 e HGs-P407.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°	Graus
°C	Graus Celsius
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singleto
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio tripleto
AJCC	Comitê conjunto americano de estadiamento de câncer
ATR	Refletância total atenuada
CDDP	Cisplatina
CH <sub>3</sub> COOH	Ácido acético
Chl	Clorofila
Chl <sub>a</sub>	Clorofila a
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FS	Fotossensibilizante
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GCO	Global cancer observatory
GSH	Glutathionas
h	Horas
HG-Chl <sub>a</sub>	Hidrogel contendo Cloforila a
HGs	Hidrogéis
HP14	Hidrogel de poloxamer 407 a 14%
HP14Q	Hidrogel de poloxamer 407 a 14% contendo quitosana a 1%
HP16	Hidrogel de poloxamer 407 a 16%
HP16Q	Hidrogel de poloxamer 407 a 16% contendo quitosana a 1%
HP18	Hidrogel de poloxamer 407 a 18%
HP18Q	Hidrogel de poloxamer 407 a 18% contendo quitosana a 1%

HP20	Hidrogel de poloxamer 407 a 20%
HP20Q	Hidrogel de poloxamer 407 a 20% contendo quitosana a 1%
INCA	Instituto nacional de câncer
ITM	Metástases em trânsito
LED	Diodo emissor de luz
MF	Mistura física
min	Minutos
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N/A	Não aplicável
mN	Força de deslocamento
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
OMS	Organização mundial da saúde
P407	Poloxamer 407
PBS	Phosphate buffered saline
PEO	Polioxietileno
PPG-Nano	Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia
PPO	Polioxipropileno
PS	Photosensitizer
QS	Quitosana
RT	Radioterapia
s	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
Sol. Chl <sub>a</sub>	Solução de clorofila a
Sol. Et	Solução de etanol
T <sub>sol-gel</sub>	Transição sol-gel
UnB	Universidade de Brasília
USA	United States of America
UV	Radiação Ultravioleta
VS	Versos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Melanoma.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Incidência de Melanoma Cutâneo no Brasil e no Mundo.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Diagnóstico Clínico.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Tratamento e Resistência Terapêutica.....</b>	<b>22</b>
2.4.1 Processo cirúrgico.....	22
2.4.2 Radioterapia (RT).....	23
2.4.3 Quimioterapia (QT).....	23
2.4.4 Imunoterapia.....	23
2.4.5 Terapias Adjuvantes.....	24
2.4.6 Resistência Terapêutica.....	24
<b>2.5 Terapia Fotodinâmica (TFD).....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Clorofila a (Chl_a, em inglês).....</b>	<b>27</b>
<b>2.7 Hidrogéis (HGs).....</b>	<b>28</b>
<b>2.8 Quitosana (QS).....</b>	<b>29</b>
<b>2.9 Poloxamer 407 (P407).....</b>	<b>30</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Materiais e Reagentes.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Formulação dos HGs.....</b>	<b>34</b>
5.2.1 Incorporação da Chl_a nos HGs.....	34
<b>5.3 Estudos de Caracterização.....</b>	<b>35</b>
5.3.1 Avaliação da Temperatura de Transição Sol-Gel ( $T_{sol-gel}$ ) dos HGs.....	35
5.3.2 Avaliação do Tempo de $T_{sol-gel}$ .....	35
5.3.3 Ensaios de Bioadesão <i>in vitro</i> .....	36
5.3.4 Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR).....	36

5.3.5 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
<b>5.4 Ensaios Biológicos.....</b>	<b>37</b>
5.4.1 Condições de Cultivo Celular.....	37
5.4.2 TFD mediada por HG-QS-P407 Contendo Chl_a.....	37
5.4.3 Ensaios de Viabilidade Celular.....	37
<b>5.5 Análise Estatística.....</b>	<b>38</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6.1 Estudos de Caracterização.....</b>	<b>39</b>
6.1.1 Avaliação das Propriedades de T <sub>sol-gel</sub> das Formulações.....	39
6.1.2 Estudo de Bioadesão <i>in vitro</i> .....	42
6.1.3 Caracterização por FTIR-ATR.....	43
6.1.4 Caracterização por MEV.....	45
<b>6.2 Ensaios Biológicos.....</b>	<b>46</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O melanoma maligno é o tipo de câncer de pele mais agressivo, em que fatores genéticos e ambientais estão envolvidos intimamente no seu desenvolvimento (Jhappan, Noonan; Merlino, 2003; Gray-Schopfer, Wellbrock; Marais, 2007). Ele se forma a partir de fenótipos malignos do melanócito da epiderme, que é responsável por sintetizar a tirosina e possui melanina, essas células cancerosas se originam da crista neural no estado de desenvolvimento e podem migrar para a pele, olhos, orelhas e folículos pilosos (Gray-Schopfer, Wellbrock; Marais, 2007). Existem quatro tipos de apresentações clínicas dos melanomas: extensivo superficial, nodular, lentigo maligno e acral-lentiginoso, sendo o extensivo superficial o tipo de apresentação clínica mais comum no Brasil. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no triênio de 2020-2022 haverá uma taxa de 8.450 novos casos de melanoma maligno de pele por ano, sendo 4.200 do sexo masculino e 4.250 do sexo feminino (INCA, 2022). Associado a isso, observa-se que a incidência de melanoma no mundo tem aumentado continuamente, segundo dados do último relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), o qual mostra que em 2020 houve aproximadamente 324.635 novos casos de câncer de pele do tipo melanoma no mundo (WHO, 2020).

Uma das características mais comum das células de melanoma é uma maior produção de melanina pelos seus melanossomos, quando comparada aos melanócitos normais ou mesmo aos melanócitos de câncer de pele não melanoma. Isso se dá pelo aumento das enzimas que participam especificamente do processo de melanogênese (Raposo; Marks, 2002; Hearing, 2005). Dessa forma, seu tratamento deve considerar fortemente os melanossomos como alvo terapêutico para obter efetividade nesse tipo de neoplasia maligna (Chen *et al.*, 2009). Correlacionado a isso, o melanoma apresenta resistência terapêutica a tratamentos convencionais como a quimioterapia (QT) e radioterapia (RT), como também, é evidenciado resistência a novas propostas terapêuticas, como a imunoquimioterapia, bioquimioterapia e direcionamento de células-tronco do melanoma (Chen *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2005).

Desse modo, novas alternativas de tratamento com novos mecanismos de ação são necessárias para o enfrentamento dessa neoplasia. Assim, estudos de potenciais fármacos terapêuticos incorporados em nanoformulações tem se tornado um método atrativo, pois apresentam maior estabilidade e permeabilidade que favorece o acúmulo de maior quantidade de compostos em tumores potencializando sua ação farmacológica (Maeda *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2011). Entre esses diversos tipos de biomateriais investigados, os hidrogéis (HGs) vêm se destacando por suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade,

propriedades mecânicas e repostas rápida a meios externos (Pellá *et al.*, 2018). Os HGs são constituídos por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos que em contato com a água ou fluidos biológicos se abrem (Grainger, 2013; Kakkar; Madhan, 2016) e dependendo do método de síntese são classificados como géis químicos ou físicos.

Essa capacidade de abertura das malhas dos HGs pós-estímulo externo ou natural permite a difusão de fármacos em um tecido-alvo, tornando essa técnica atrativa em aplicações biomédicas. Esse estímulo externo pode ser efetuado por meio da irradiação de luz, pH, campo magnético e temperatura, permitindo também uma liberação controlada do fármaco (Pellá *et al.*, 2018). Associado a isso, fotossensibilizantes (FS) incorporados à HGs para aplicação em terapia fotodinâmica (TFD) pode promover ativação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) induzindo a morte de células cancerosas podendo auxiliar de forma efetiva no tratamento do câncer de pele.

A TFD promove uma reação fotoquímica que ocorre por meio de um FS, uma fonte de luz específica e oxigênio, em que o FS é ativado por uma luz com um comprimento de onda específico, e que na presença de oxigênio, haverá transferência de energia do FS para o oxigênio disponível que resultará em EROs e/ou  $^1\text{O}_2$ , que irá ocasionar desordem na parede celular e danos ao Ácido Desoxirribonucleico (DNA) induzindo a morte celular e destruição do tecido doente (Dolmans *et al.*, 2003; Konopka; Goslinski, 2007; Celli *et al.*, 2010).

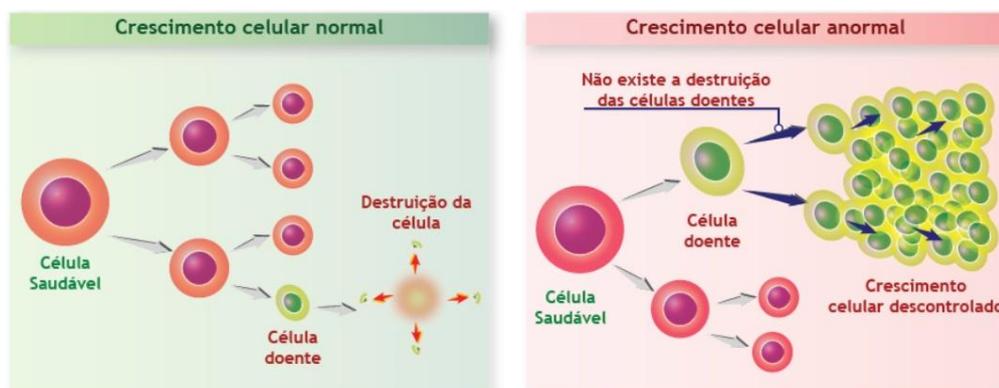
Nesse sentido, um potencial FS incorporado a HGs aplicado na TFD pode promover a ativação de EROs induzindo a morte de células cancerosas. Dessa forma, este estudo avaliou a atividade anticancerosa do FS clorofila a (Chl\_a, em inglês) incorporada a HGs à base de quitosana (QS) e poloxamer 407 (P407) aplicado na TFD *in vitro* frente à linhagem celular de melanoma murino B16-F10.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Melanoma

O melanoma é uma doença que tem origem nos melanócitos, que são células de origem neuroectodérmica responsáveis por produzir pigmentos, onde sua apresentação clínica mais comum é a forma cutânea que corresponde a 91,2% de melanoma no mundo, tendo também apresentações clínicas nas formas de melanoma ocular (5,2%), que é o tipo de apresentação clínica mais comum em tumores maligno intra-ocular primário, e o melanoma mucoso (1,3%), que pode acometer qualquer membrana mucosa do corpo (Carr, Smith; Wernberg, 2020).

No melanoma cutâneo, o diagnóstico pode variar conforme o subtipo clínico-patológico, pois essa doença possui quatro apresentações clínicas, que são: melanoma extensivo superficial, com incidência de 70-75% dos casos, melanoma nodular, com 20-25% dos casos, melanoma lentigo maligno, com prevalência de 5-10% dos casos e o melanoma acral-lentiginoso, que corresponde a 5% dos casos de melanoma cutâneo (Saldanha *et al.*, 2006). Destes tipos de apresentações clínicas, o principal fator de risco que contribui para o desenvolvimento de melanoma cutâneo é a exposição à radiação ultravioleta (UV) que pode danificar a molécula de DNA por meio de mutações gênicas que controlam a divisão celular e regulam a expressão de fatores de crescimento, sendo como mutação mais comum no oncogene BRAF, podendo ocorrer também mutações nos genes NRAS, NF1 e CDKN2A (Lawrence *et al.*, 2013). A Figura 1 mostra um esquema de proliferação celular anormal que dar origem ao melanoma cutâneo.



**Figura 1.** Representação esquemática da proliferação de células melanocíticas. Fonte: Adaptado de Oncomais, 2015.

O melanoma extensivo superficial está associado às infrequentes exposições aos raios UV e não possui uma região do corpo específica para a lesão ocorrer, podendo acometer partes superiores das costas, tórax e as pernas em ambos os sexos, possuindo também, propensão à multicoloração de bronzeamento. Já o melanoma nodular, surge a partir de lesões provocadas por exposição a raios UV, frequentemente aparecendo nas regiões do pescoço, cabeça e tronco, tendo como características morfológicas: superfície lisa em forma de cúpula, aparência fungosa, sendo comumente ulceradas, e tendo o sangramento como sinal de estado avançado da doença. O melanoma lentigo maligno inicia a partir de uma mancha com forte tom de bronzeamento que se intensifica gradualmente escurecendo ao longo dos anos. Ela tende a acometer pacientes idosos que tiveram suas peles expostas há anos aos raios UV. E por último, e não menos importante, tem o melanoma acral-lentiginoso, que apresenta padrões, como: crescimento do nevo juncional, margens indistintas e um crescimento vertical, características estas adquiridas ao longo dos anos, se mostrando pouco associada à exposição aos raios UV (Forman *et al.*, 2008; James, Berger; Elston, 2011).

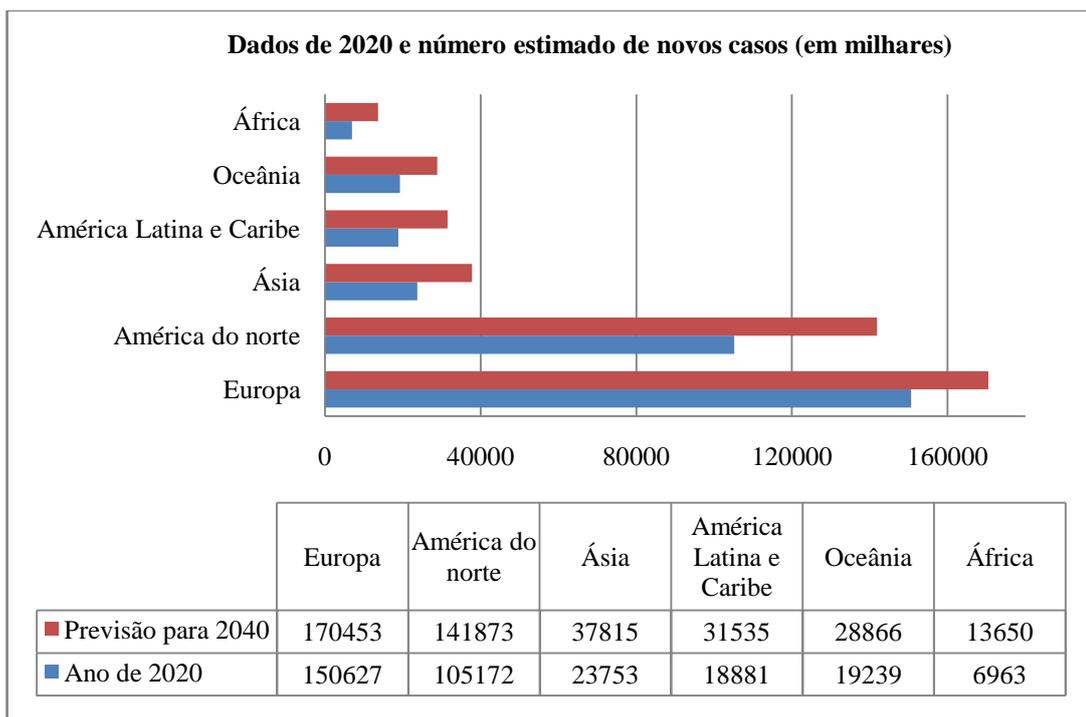
O melanoma cutâneo, também pode se apresentar de forma amelanótico, ou seja, com a ausência total de pigmentação ou possuir um número ínfimo de melanóticos nas células neoplásicas, podendo ser até confundido com outros tipos de pigmentos. Nesse tipo de tumor, as células cancerosas não realizam a síntese de melanina intracitoplasmática o que representa 1,8 a 8,1% dos casos de melanoma cutâneo, podendo ocorrer tanto em estágio de melanoma cutâneo primário quanto em casos de melanoma metastático (Sulaimon, Kitchell; Ehrhart, 2002; Koch; Lange, 2000).

## **2.2 Incidência de Melanoma Cutâneo no Brasil e no Mundo**

A incidência global de câncer de pele do tipo melanoma tem aumentado gradativamente nas últimas décadas. Dados do último relatório da OMS mostram que em 2020 houve aproximadamente 324.635 novos casos (WHO, 2020). Só nos Estados Unidos da América (EUA), houve um crescimento médio de 270% nos últimos 30 anos, esse aumento foi atribuído a diversos fatores, entre eles o aumento da exposição à luz UV artificial em clínicas estéticas de bronzeamento e ao estilo de vida, assim como, fatores ambientais e genéticos (Rastrelli *et al.*, 2014). No Brasil, o INCA aponta para o triênio de 2020-2022 uma taxa de 8.450 novos casos de melanoma maligno de pele por ano, sendo 4.200 do sexo masculino e 4.250 do sexo feminino (INCA, 2022).

Esse tipo de neoplasia é diagnosticado com mais frequência em caucasianos, com prevalência de 2,6%, seguido pelos hispânicos (0,58%) e afro-americanos (0,1%) (ACS, 2021). Observa-se que os caucasianos são mais propensos a desenvolver melanoma cutâneo ao longo da vida, entretanto, hispânicos e afro-americanos têm maior probabilidade de desenvolver melanoma não cutâneo, que são mais difíceis de serem diagnosticados, portanto, quando o tumor se manifesta já se apresenta em estágio avançado limitando o tratamento e elevando o risco de vida do paciente diagnosticado com melanoma não cutâneo (Dawes *et al.*, 2016).

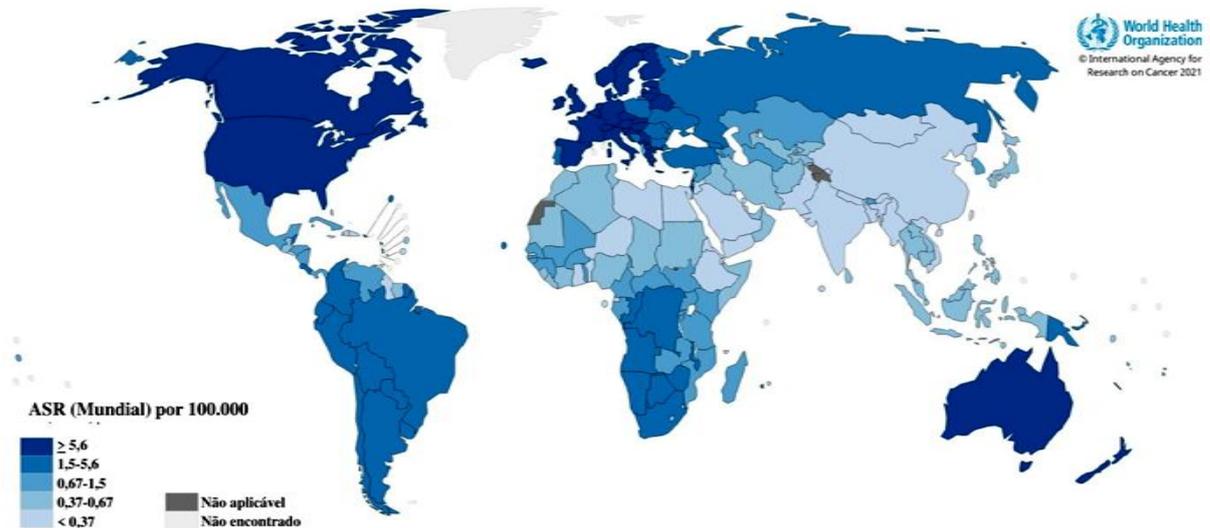
A OMS, ainda apresenta uma estimativa de aumento do número de novos casos de melanoma cutâneo para os próximos 19 anos, que prevê um aumento médio de 100.000 novos casos por ano no mundo, onde a África terá um aumento estimado de 96%, seguida da América Latina e Caribe com 67%, Ásia com 59% e a Oceania com 50%, conforme apresentado na Figura 2 (WHO, 2020).



**Figura 2.** Número de casos de câncer de pele do tipo melanoma no ano de 2020 e estimativa de novos casos de 2020 a 2040, ambos os sexos, idade [0-85 +]. Adaptado da WHO (2020).

Esse aumento do número de novos casos mostra a gravidade que os sistemas de saúde enfrentam e irão enfrentar até o ano de 2040, em especial, nos EUA e países da Europa, que possuem as maiores taxas de incidência de melanoma cutâneo do mundo (Figura 3) (GCO, 2021). Nos EUA, o melanoma cutâneo é o quinto tipo de câncer que mais acomete o sexo

masculino e o sexto que mais acomete o sexo feminino (Gershenwald; Guy, 2016). Entretanto, o país com maior taxa de incidência de melanoma maligno do mundo é a Austrália, tendo como principais vítimas adolescentes com idade ao redor de 15 anos e adultos com média de 44 anos, em ambos os sexos (Watts *et al.*, 2017).



**Figura 3.** Taxa de incidência Mundial de melanoma cutâneo no ano de 2020, padronizada por idade em ambos os sexos. Fonte: GCO - Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, França: International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>, acessado em 25/07/2022; Fonte de dados: GLOBOCAN 2021. Produção de imagens, IARC: <https://gco.iarc.fr/today/home>, World Health Organization. (com edições feitas pelo autor).

Esse crescimento de diagnósticos do melanoma cutâneo em todo o mundo vem preocupando autoridades governamentais, pois o índice de novos casos está crescendo acima de outras doenças malignas (Kohler *et al.*, 2011). Outro dado preocupante é o número cada vez mais frequente de novos casos em jovens (Siegel; Naishadham; Jemal, 2012; Bray *et al.*, 2018). Outro dado intrigante é em relação ao sexo, mulheres entre 20-24 anos de idade possuem maiores chances de serem diagnosticadas com melanoma cutâneo do que os homens da mesma idade. No entanto, os dados se invertem a medida que os anos de vida se prolongam, em que os homens se tornam mais propensos a serem diagnosticados com melanoma cutâneo em relação às mulheres (Yuan *et al.*, 2019).

### 2.3 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico do melanoma depende do subtipo clínico-patológico da doença, conforme foi apresentado na seção 2.1. Características como: bordas irregulares, lesão assimétrica, diâmetro de 5 mm ou acima, variabilidade de cor da lesão, e surgimento ou

crescimento de nódulos são aspectos importantes para diagnósticos clínicos de melanoma (Garbe *et al.*, 2016). A maioria dos diagnósticos clínicos de melanoma ocorre na fase primária, sendo que em 90% dos casos não há evidência de metástase, o que aumenta as chances de cura em até 75-85%. O prognóstico do paciente se baseia em fatores histológicos como analisar a profundidade do tumor, técnica conhecida como índice de Breslow, que medirá por meio de uma escala óptica em micrômetro o tamanho do tumor. Essa técnica consiste em penetrar desde a epiderme até o ponto final da lesão obtendo-se a medida histológica do melanoma (Balch *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2011). Também é realizada a medição da taxa mitótica, para subclassificar o tipo de melanoma, conforme consta no Comitê Conjunto Americano de Estadiamento de Câncer (AJCC, em inglês). Como também, é mensurado o nível de invasão do tumor ou nível de Clark (Scolyer *et al.*, 2006). Além disso, são realizados testes histológicos para identificar a presença de ulceração de melanoma, que normalmente possuem as seguintes características: hiperplasia reativa do ambiente circundante, diminuição da espessura da membrana basal e o adelgaçamento de estrato córneo (Spatz *et al.*, 2003). Assim, é realizado o prognóstico do paciente com melanoma identificando se o tumor está na fase primária e fora de risco de metástase.

Quando o diagnóstico clínico identifica a metástase, o paciente possui uma sobrevida limitada, dependendo do tipo de metástase desenvolvida. A metástase de melanoma pode ocorrer de duas formas, pela via linfática ou hematogênica, sendo a maioria dos casos localizada na região dos linfonodos regionais. Dessa forma, uma sobrevida de 10 anos, para metástase satélite (até 2 cm do tumor primário) irá possuir de 30-50% de chances de cura, em pacientes com micrometástase linfonodais as chances são de 30-70%, e para pacientes com metástase linfonodais regionais as chances diminuem para 20-40% de chances de cura (Balch *et al.*, 2009).

## **2.4 Tratamento e Resistência Terapêutica**

### **2.4.1 Processo Cirúrgico**

O processo cirúrgico é considerado o tratamento primário, podendo ser realizado uma dissecação dos linfonodos, excisão ampla e até amputação do membro quando o diagnóstico é localizado em dedos, mãos e pés (Eggermont; Spatz; Robert, 2014; Saiag *et al.*, 2007), sendo normalmente realizada uma biópsia excisional, que permitirá ao patologista avaliar com precisão as margens de excisão para tumor residual. Além disso, o procedimento é

fundamental para confirmar o prognóstico estabelecido em casos mais difíceis de diagnóstico, como em melanoma lentigo maligno na face, melanoma acral ou melanoma mucoso (Martin *et al.*, 2005; Pflugfelder *et al.*, 2010).

#### 2.4.2 Radioterapia (RT)

Outro tratamento disponível para casos de melanoma é a RT, que consiste de radiações ionizantes, como os raios-X. O procedimento é considerado indolor e não visível, que causará danos ao DNA das células não tumorais e tumorais, resultando em morte celular. Em caso de melanoma com metástase em trânsito (ITM, em inglês) a RT atuará de forma efetiva no controle de proliferação celular, uma vez que nesse estágio a cirurgia não será efetiva, pela extensão da lesão tumoral no paciente (Olivier *et al.*, 2007). Por outro lado, é pouco utilizada no estágio primário, pois neste caso, o tratamento de escolha é a cirurgia (Garbe *et al.*, 2016).

#### 2.4.3 Quimioterapia (QT)

O tratamento por QT é realizado utilizando-se quimioterápicos, como Dacarbazina, Temozolomida, Nab-paclitaxel, Paclitaxel, Cisplatina (CDDP), Carboplatina, entre outros. Estes possuem potencial citotóxico frente células cancerosas e não cancerosas. No entanto, esses fármacos possuem alta toxicidade e induzem também a morte de células saudáveis causando infertilidade, alterações gastrintestinais, alopecia, entre outros efeitos adversos, o que leva a uma rápida debilitação do paciente, que em casos mais agressivos a QT é suspensa (De Souza *et al.*, 2014; Morachis; Mahmoud; Almutairi, 2012).

#### 2.4.4 Imunoterapia

A imunoterapia consiste em utilizar o próprio sistema imunológico do paciente contra a neoplasia. O tratamento consiste em estimular e auxiliar as células de defesas do corpo para identificar o antígeno, criar o anticorpo e combatê-lo, assim como, pode ocorrer uma resposta imunitária celular bloqueadora sem a necessidade de um anticorpo (Nagai *et al.*, 2010). No entanto, há dificuldades consistentes em estimular o sistema imune para combater o câncer, pois células cancerosas em estágios avançados possuem mecanismos de defesa que conseguem evadir da morte e proteger o tumor “enganando” o sistema imunitário por meio de mecanismos de sinalizações (Garbe *et al.*, 2016).

Por outro lado, quando se obtém êxito no tratamento, o sistema imunológico identifica o antígeno e ataca o tumor levando a morte das células cancerosas de forma rápida e sem provocar danos a células saudáveis. Os principais tipos de imunoterapias aplicadas são: anticorpos monoclonais, vacinas, inibidores de pontos de verificação imunológica e a terapia do receptor de antígenos quimérico de células T (CAR T-Cells) (Zhang *et al.*, 2014).

#### 2.4.5 Terapias Adjuvantes

Além desses tratamentos mencionados, existe o método de terapia combinada que é conhecida como terapia adjuvante. Ela consiste na adição de uma terapia pós-tratamento primário, às quais abrangem procedimentos cirúrgicos, RT, QT, crioterapia e/ou laserterapia. Essa estratégia terapêutica é aplicada apenas em pacientes que não estão em estágio de metástase microscópica, mas que possuem alto risco de evoluir para esse estágio (Garbe *et al.*, 2016). Estudos reforçam sua aplicação apenas em pacientes com tumores mais espessos (1,5 mm) ou em casos de melanomas em estágios II e/ou III conforme segue as recomendações da AJCC (Balch *et al.*, 2009).

Nesse sentido, a terapia adjuvante apresentou efetividade no tratamento de diversos tumores resistentes a fármacos quimioterápicos, pois, terapias combinadas visam obter uma sinergia com capacidade de alcançar diferentes alvos celulares no corpo, o que aumenta as chances de cura do paciente. Além disso, potencializa a atividade citotóxica anticélulas cancerosas e reduz os efeitos colaterais (Al-Lazikani; Banerji; Workman, 2012; Mignani *et al.*, 2015). Essa diminuição dos efeitos colaterais ocorre pela redução da concentração das doses dos quimioterápicos administrados, que possuem elevada taxa de toxicidade. Uma vez que a administração desses fármacos é realizada em doses menores, ela é complementada com outra terapia, o que aumenta a tolerabilidade e a adesão do paciente ao tratamento, além de obter uma resposta mais rápida e eficiente (Cather; Crowley, 2014).

#### 2.4.6 Resistência Terapêutica

De forma resumida, o melanoma possui mecanismos de resistência terapêutica devido a sua elevada capacidade de sobrevivência e motilidade (Bai; Fisher; Flaherty, 2019). Quando comparada a outras células tumorais, as células de melanoma em ensaios *in vivo* possuem baixo índice de morte celular por apoptose espontânea, e em ensaios *in vitro* é relatado resistência a apoptose induzida por fármacos (Sosman; Puzanov, 2006). Dessa maneira, como

a maioria dos quimioterápicos atua na indução de apoptose, a resistência do melanoma a esses quimioterápicos pode estar relacionada a não ativação dos mecanismos de morte celular.

A ativação desses mecanismos de resistência terapêutica é complexa e age de forma diferente para cada quimioterápico utilizado, como por exemplo, a resistência do melanoma à CDDP. Normalmente ela ocorre quando há uma falha na capacidade da célula entrar em apoptose, isso pode acontecer por causa da exposição crônica da célula ao quimioterápico ou por meio da capacidade intrínseca da célula tumoral de evadir da morte, como a seleção de clones que apresentam mecanismos de resistência ao quimioterápico (Kelland, 2000).

Os principais fatores que estimulam a resistência estão relacionados à redução do acúmulo intracelular da CDDP por diminuição da sua captação, aumento da extrusão do fármaco por meio do receptor MRP2, ou uma combinação desses dois fatores (Siddik, 2003), aumento nos níveis intracelulares de tióis (Kelland, 2000), inativação da CDDP por meio de moléculas nucleofílicas, como as glutationas (GSH), que são superexpressas quando há uma exposição crônica ao quimioterápico (Kelland, 2000), aumento no mecanismo de reparo de DNA, especialmente pelo reparo de excisão de nucleotídeos (Furuta *et al.*, 2002), aumento da expressão de Bcl-2 e superexpressão de proteínas envolvidas na sobrevivência celular, como a PI3K/AKT e RAS/MARK (Hung; Lau, 1999; Isonishi *et al.*, 2001), como também, pode induzir uma configuração ativa da proteína quinase, sendo ativada uma cascata de sinalização que estimula a sobrevivência e o crescimento das células cancerosas, em que a configuração ativa dos genes BRAF, RAS e NF1, estão intimamente atreladas a todos os tipos de melanoma, sendo 50, 25 e 15%, respectivamente (Engelman; Settleman, 2008; Wagle *et al.*, 2011). Essas mutações também provocam uma reativação de vias oncogênicas ao invés de produzir novas vias por meio da angiogênese, o que caracteriza como um processo de resistência adquirida durante ou após o tratamento (Nazarian *et al.*, 2010).

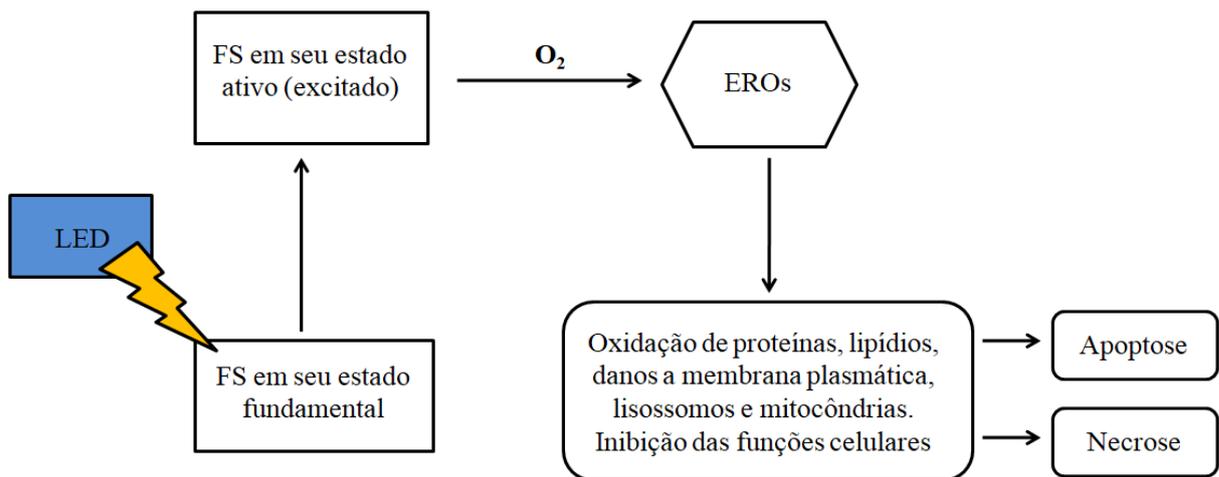
No entanto, ainda é prematuro traçar incisivamente toda a dinâmica que ocorre no processo de resistência terapêutica, pois além de ser bastante complexa não se tem quantidades suficientes de estudos com resultados conclusivos, devido às limitações, como a escassez de amostras de tumores ao longo da terapia para elucidar suas mudanças fisiológicas.

## **2.5 Terapia Fotodinâmica (TFD)**

A TFD é uma terapia minimamente invasiva e apresenta eficácia em diversos estudos com tumores sólidos e lesões não malignas, como apresentados em estudos de Gray e Fullarton (2007), que avaliaram a eficácia da TFD em displasia de esôfago, Kato *et al.* (2004),

em câncer de pulmão, entre outros estudos contra o câncer (Allison *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2009; Guyon *et al.*, 2012). Além disso, a TFD combinada a outras terapias anticâncer eleva as chances de cura como foi evidenciado em estudos de Kim, Lee e Cho (2013), que combinaram a TFD com a crioterapia no tratamento do carcinoma basocelular nodular.

Resumidamente, a TFD promove uma reação fotoquímica que ocorre por meio de um FS, luz e oxigênio. O FS excitado com luz transfere energia a outras espécies químicas formando assim EROs. Essas EROs são moléculas altamente reativas e instáveis com capacidade de modificar outras moléculas (Mroz *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2012). Essas moléculas irão promover desordem na parede celular e levar danos ao DNA induzindo a morte de células cancerosas destruindo o tecido doente (Dolmans *et al.*, 2003; Konopka; Goslinski, 2007; Celli *et al.*, 2010), como podemos observar no esquema ilustrado na Figura 4.



**Figura 4.** Mecanismo de funcionamento da TFD. Nota: (LED) Diodo emissor de luz; (EROs) Espécies reativas de oxigênio; (O<sub>2</sub>) Oxigênio molecular; (FS) Fotossensibilizante. Fonte: Próprio autor (2022).

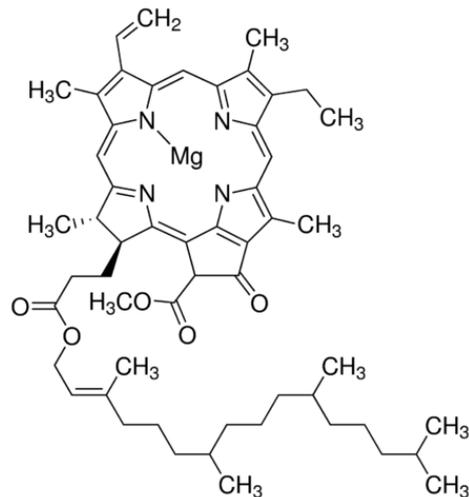
Essa efetividade da TFD ocorre pela ativação de um FS, em que no seu estado tripleto de excitação deve possuir um tempo de vida prolongado o que pode interagir com diferentes moléculas circundantes (fotorreação tipo I), ou reagir com oxigênio molecular (fotorreação tipo II) (Machado, 2000). Sendo a fotorreação do tipo II de interesse em aplicações biomédicas com a TFD antineoplasias malignas, pois o FS no estado tripleto irá reagir com oxigênio molecular e em seguida promover a mudança do estado fundamental do O<sub>2</sub> ou oxigênio tripleto (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) para o estado excitado do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Paszko *et al.*, 2011), em que nesse estado, há reação do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> com diversas moléculas circundantes, como mitocôndrias, ácidos nucleicos e proteínas, promovendo danos oxidativo às moléculas em até três níveis distintos, sendo o primeiro nível a morte celular por apoptose, necrose ou autofagia, no segundo nível pode

ocorrer isquemia tumoral pós-lesão vascular e o terceiro nível, pode estimular a ativação do sistema imunológico contra antígenos tumorais (Monge-Fuentes *et al.*, 2014).

Um FS atrativo em aplicações biomédicas anticâncer deve apresentar uma absorvidade molar dentro da região espectral de 600-900 nm, conhecida como a “janela fototerapêutica” tendo essa absorvidade como ideal na penetração profunda de tecidos pigmentados em aplicações biomédicas (Zhang *et al.*, 2017). Por outro lado, ainda não foi identificado um FS efetivo clinicamente no tratamento de melanoma maligno, pois nesse tipo de câncer a melanina compete com o FS à absorção de luz empregada na TFD, pois a melanina é um fotoprotetor natural da pele que possui a capacidade de absorver luz irradiada da TFD em um comprimento de onda entre 400-750 nm (Ma *et al.*, 2007). Como podemos observar essa constatação em diversos estudos que reforçam esse desafio enfrentado na TFD no tratamento do melanoma (Zhao *et al.*, 2009; Monge-Fuentes *et al.*, 2014). Portanto, a busca por um FS ideal torna-se essencial para o desenvolvimento de novas terapias efetivas, menos invasivas e efeitos colaterais mínimos no tratamento do melanoma, como composição estável, atóxica na ausência da TFD, auto-agregação mínima, fotoestabilidade, entre outras propriedades (Bechet *et al.*, 2008).

## **2.6 Clorofila a (Chl\_a, em inglês)**

Um FS atrativo em estudos da TFD é a Chl\_a (Figura 5), composto presente nas plantas, algas e em cianobactérias. Esse pigmento é essencial no processo de fotossíntese das plantas, correspondendo a 75% do total de Chl existente. Ela está intimamente relacionada com a cor esverdeada das folhas das plantas, e isso ocorre porque a Chl\_a possui absorção de luz nos comprimentos de onda violeta (380-440 nm) e azul (440-485 nm) (Berg; Tymoczko; Stryer, 2002). Essa propriedade de absorção de luz permite o direcionamento de energia solar em energia química através do processo de fotossíntese. Nesse processo ela converte dióxido de carbono e água em carboidrato e oxigênio molecular (Streit *et al.*, 2005).



**Figura 5.** Estrutura química da clorofila a (Chl\_a). Fonte: Sigma - Aldrich (2022).

## 2.7 Hidrogéis (HGs)

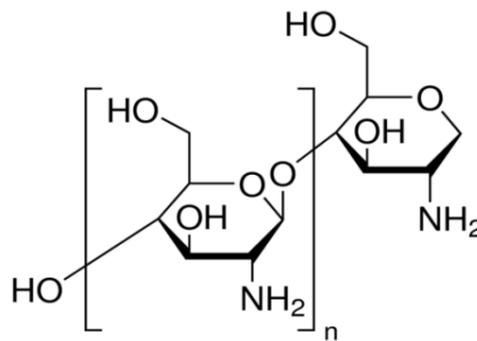
Os HGs são biomateriais formados por uma rede tridimensional de polímeros e copolímeros hidrofílicos, que distendem quando entram em contato com a água ou fluidos biológicos (Grainger, 2013; Kakkar; Madhan, 2016; Lima-Tenório *et al.*, 2015a; Soares *et al.*, 2014). A preparação de HG distingue-se entre HG físico e químico, sendo que HG físico envolve cadeias poliméricas em interações moleculares dos tipos: ligações de hidrogênio, ligações iônicas e ligações hidrofóbicas. Por outro lado, HG químico ocorre por reticulação química (simultaneamente ou pós-polimerização), em suas cadeias poliméricas há interações moleculares irreversíveis por meio de ligações covalentes (Ullah *et al.*, 2015). Esses biomateriais vêm se tornando atrativo em aplicações biomédicas pela sua capacidade de dilatação após estímulos naturais ou externos como a irradiação de luz, pH, campo magnético e temperatura, o que permite a difusão de propriedades farmacológicas em um tecido-alvo, em que essas características responsivas a estímulos permitem a liberação controlada de fármaco (Pellá *et al.*, 2018).

Além dessas propriedades mencionadas, existem inúmeras outras características potenciais como a biodegradabilidade, grau de intumescimento e resistência mecânica que estão envolvidas intimamente aos métodos de reticulação (Ullah *et al.*, 2015). Por isso, a síntese de HG à base de polissacarídeos tem levantado interesse da comunidade científica, pois possuem propriedades favoráveis para formulações de biomateriais, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, são atóxicas e de baixo custo (Lima-Tenório *et al.*, 2015b). Os principais polissacarídeos utilizados para a síntese de HGs em aplicações

biomédicas são: amido, alginato, carragenina, carboximetilcelulose e a QS (Lima-Tenório *et al.*, 2015b).

## 2.8 Quitosana (QS)

A QS (Figura 6) é um polímero obtido pela desacetilação da quitina, que se destaca por ser um dos polissacarídeos naturais de amido mais abundante na natureza, e que pode ser extraído de exoesqueletos de crustáceos, insetos e da parede celular de fungos (Soares *et al.*, 2014). Além da facilidade de obtenção da QS e suas propriedades favoráveis, como a biodegradabilidade, propriedades mucoadesivas e ser atóxica em baixas concentrações, ela também possui propriedades que podem elevar a capacidade de penetração do fármaco ao adentrar entre as camadas epiteliais, o que pode potencializar a ação farmacológica (Jin *et al.*, 2016; Mohammed *et al.*, 2017).

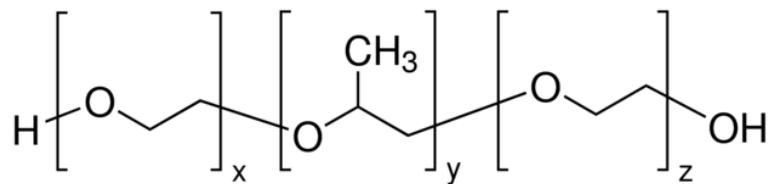


**Figura 6.** Estrutura química da quitosana (QS). Fonte: Sigma - Aldrich (2022).

Apesar das vantagens mencionadas acima, existem limitações em formulações de HGs sintetizadas apenas à base de QS, pois seu rearranjo estrutural permite apenas a difusão passiva de propriedades farmacológicas ou resíduos metabólicos, o que limita sua eficácia em aplicações biomédicas, além de apresentar rápida degradação (Chen *et al.*, 2017; Kiene *et al.*, 2018). No entanto, isso é solucionado ao combinar a QS com polímeros naturais ou sintéticos o que ajusta as propriedades dos HGs. Nestes casos, polímeros são escolhidos conforme as propriedades desejadas obtendo-se um biomaterial hídrico que são intrinsecamente responsivos a estímulos externos, como irradiação de luz, pH e temperatura. Além disso, a síntese de HGs à base de QS fisicamente reticulados também proporciona propriedades de autocura (self-healing), tendo levantado interesse na área médica nas últimas décadas (Pellá *et al.*, 2018).

## 2.9 Poloxamer 407 (P407)

O P407 (Figura 7) é um dos copolímeros mais utilizados em formulações de sistemas termossensíveis, pertencente ao grupo dos copolímeros de tribloco não iônico e conhecido como Pluronic® F-127. Comercialmente, ele se apresenta em três blocos, sendo um bloco hidrofóbico com unidades polioxipropileno (PPO) e mais dois blocos hidrofílicos com unidades polioxietileno (PEO) (Devi *et al.*, 2013; Karolewicz, 2015). Além do P407, existe uma variedade de poloxâmeros disponíveis na indústria química, com componentes e pesos moleculares distintos, que podem variar de 1.100 a 14.000 Da. O P407 é o poloxâmero mais investigado em estudos biomédicos pela sua capacidade de formar micelas em soluções com características de auto-organização, e que pode resultar em um gel viscoso que irá depender da temperatura e da concentração do polímero empregado (Caramella *et al.*, 2015; Klouda, 2015; Juhasz, 1989).



**Figura 7.** Estrutura química do poloxamer 407 (P407). Fonte: Sigma - Aldrich (2022).

Vale ressaltar que os poloxâmeros possuem limitações acerca da sua resistência mecânica o que pode levar os biomateriais a uma rápida erosão (El-kamel, 2002). Por outro lado, essa desvantagem pode ser resolvida misturando a QS com poloxâmeros na formulação (Gratieri *et al.*, 2010). Essa mistura prolonga o tempo de contato dos HGs na superfície, favorecendo o uso *in situ* desses sistemas, em que a resistência mecânica dos HGs é restabelecida e melhorada conforme apresentado em estudos de Gupta *et al.* (2007). Neste estudo os autores desenvolveram um sistema de gel à base de QS e P407, obtendo uma formulação com as respectivas características: oftálmica límpida, estéril e não irritante.

### 3 JUSTIFICATIVA

O crescente número de casos de melanoma no Brasil e no mundo, além das projeções realizadas pela OMS que prevêem aumento médio de 100 mil novos casos ao ano em todo o mundo até o ano de 2040 (WHO, 2020), mostra os desafios que órgãos governamentais irão enfrentar ao longo desses anos, sendo necessárias novas estratégias de tratamento que apresentem maior eficácia e menos efeitos colaterais. Além disso, sabe-se que o melanoma possui mecanismo de resistência terapêutica devido a sua capacidade intrínseca da célula tumoral de evadir da morte, como a seleção de clones que apresentam mecanismos de resistência ao quimioterápico (Bai; Fisher; Flaherty, 2019). Quando comparada a outras células tumorais, as células de melanoma possuem baixo índice de morte celular por apoptose espontânea, e também, é relatado resistência a apoptose induzida por fármacos (Sosman; Puzanov, 2006).

Dessa maneira, este estudo apresenta uma proposta inovadora a partir do uso da TFD para tratar casos de câncer de pele do tipo melanoma, utilizando como FS a Chl<sub>a</sub>, um composto presente nas plantas, algas e em cianobactérias, que foi incorporada à HGs, em que, resultados de redução da viabilidade celular a partir dessa estratégia agrega no combate ao crescente número de novos casos de melanoma no Brasil e no mundo, além de ser um processo terapêutico minimamente invasivo o que proporciona efeitos colaterais mínimos e aumenta a efetividade do tratamento.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade fotodinâmica mediada por Chl<sub>a</sub> incorporada a HGs à base de QS e P407 aplicado na TFD *in vitro* frente à linhagem celular de melanoma murino B16-F10.

### 4.2 Objetivos Específicos

- I. Preparar HGs à base de QS e P407 contendo Chl<sub>a</sub> para estudos do seu princípio ativo anti-melanoma;
- II. Avaliar as características reológicas dos HGs à base de QS e P407;
- III. Estudos de caracterização estrutural do HG à base de QS e P407;
- IV. Avaliar a atividade fotodinâmica anti-melanoma do FS Chl<sub>a</sub> incorporada ao HG à base de QS e P407 frente à linhagem celular de melanoma murino B16-F10 por meio da TFD *in vitro*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Materiais e Reagentes

Os materiais e reagentes utilizados neste estudo podem ser conferidos nas Tabelas 1 e 2, abaixo.

**Tabela 1.** Lista de materiais.

<b>Materiais</b>	<b>Fabricante</b>
Criotubos	TPP, CHE
Eppendorf (1,5 e 2 mL)	Axygen, EUA
Frasco para cultura celular com filtro (75 cm <sup>2</sup> )	TPP, CHE
Hemocitômetro de Neubauer	C. A. Hausser & Son, EUA
Lamínulas para microscopia	Exacta Perfecta, BRA
Micropipeta Multicanal (200 µL)	Gilson. Inc., EUA
Micropipetas (20, 200, 1000 µL)	Gilson. Inc., EUA
Microplacas (96 poços)	TPP, CHE
Pipeta sorológica (5, 10 mL)	Axygen, EUA
Ponteiras para Micropipetas	Axygen, EUA
Tubo falcon (15, 50 mL)	Axygen, EUA

Fonte: Próprio autor (2022).

**Tabela 2.** Lista de reagentes.

<b>Reagentes</b>	<b>Fabricante</b>
Antibiótico (Penicilina e Estreptomicina)	Gibco, EUA
Azul Trypan	Sigma-Aldrich Brasil Ltda
Bicarbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Brasil Ltda
Chl_a de espinafre	Sigma-Aldrich Brasil Ltda
DMEM	Sigma-Aldrich Brasil Ltda
DMSO	Mallinckrodt Chemicals, EUA
Etanol	Sigma-Aldrich Brasil Ltda
MTT	Invitogen, EUA
P407 (Pluronic <sup>®</sup> F-127)	Sigma-Aldrich Brasil Ltda
PBS	Laborclin, BRA
QS de baixo peso molecular	Sigma-Aldrich Brasil Ltda
Soro Fetal Bovino	Gibco, EUA
Tripsina-EDTA	Gibco, EUA

Fonte: Próprio autor (2022).

## 5.2 Formulação dos HGs

Os HGs à base de QS e P407 (HG-QS-P407) foram preparados conforme protocolo de Gratieri *et al.* (2010), com algumas modificações. Resumidamente, as dispersões de QS de baixo peso molecular com concentração de 1,0 % (m/v) foram preparadas a partir da dissolução de QS em uma solução de ácido acético 1,0 % (v/v) sob agitação constante por aproximadamente 3 horas (h) até sua total homogeneização. Em seguida, o pH das dispersões de QS foram ajustados para um pH entre 6,0 e 6,5 com NaOH a 10 M. Após essa etapa, as dispersões de QS foram mantidas em banho de gelo sob agitação constante, para adição de diferentes concentrações de P407 (Tabela 3). Após a dissolução completa do P407 na dispersão de QS o HG-QS-P407 formado foi mantido em repouso em uma geladeira a temperatura de 4 °C, por no mínimo 24 h até não se observar mais bolhas no gel. As composições dos HG-QS-P407 estão mostradas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Composições e concentrações das formulações dos hidrogeis.

Identificação	QS (%)	P407 (%)
F1	1,0	14
F2	1,0	16
F3	1,0	18
F4	1,0	20
F1.A	N/A	14
F2.B	N/A	16
F3.C	N/A	18
F4.D	N/A	20

Nota: (QS) Quitosana; (P407) Poloxamer 407; (F1) Frasco 1; (F2) Frasco 2; (F3) Frasco 3; (F4) Frasco 4; (F1.A) Frasco 1A; (F2.B) Frasco 2B; (F3.C) Frasco 3C; (F4D) Frasco 4D; (%) Porcentagem; (N.A) Não aplicável. Fonte: Próprio autor (2022).

### 5.2.1 Incorporação da Chl<sub>a</sub> nos HGs

O protocolo de incorporação da Chl<sub>a</sub> em HGs-QS-P407 seguiu de forma semelhante ao descrito anteriormente (tópico 5.2), com algumas modificações. Primeiro, a QS com uma concentração de 1% (m/v) foi dispersa em uma solução de ácido acético 1% (v/v) sob agitação constante por aproximadamente 3 h até sua total homogeneização. Em seguida, o pH da dispersão de QS foi ajustado entre 6,0 e 6,5 com NaOH a 10 M. Separadamente, a Chl<sub>a</sub> foi dissolvida em 1 mL de etanol 2% (v/v) com auxílio de um banho de ultrassom (modelo: USC - 2800). Posteriormente, a Chl<sub>a</sub> foi adicionada gota a gota sob agitação constante na

dispersão de QS em um ambiente com ausência de luz. Após essa etapa, a dispersão de QS contendo Chl\_a foi mantida em banho de gelo sob agitação constante, para adição do P407. Após a dissolução completa do P407 na dispersão de QS contendo Chl\_a o HG baseado em QS e P407 contendo Chl\_a (HG-QS-P407-Chl\_a) foi formado e transferido para um tubo falcon, que em seguida foi mantido em repouso em uma geladeira a temperatura de 4 °C, por no mínimo 24 h até não ser observado bolhas no gel.

### 5.3 Estudos de Caracterização

#### 5.3.1 Avaliação da Temperatura de Transição Sol-Gel ( $T_{\text{sol-gel}}$ ) dos HGs

A avaliação da temperatura de  $T_{\text{sol-gel}}$  foi realizada em reômetro híbrido modelo HDR-1 (T.A. Instruments, Newcastle, USA) acoplado com geometria de placa com diâmetro de 40 mm. Anteriormente à análise, as amostras foram acondicionadas em banho de gelo e a temperatura da placa inferior foi ajustada para 5 °C. As amostras foram gentilmente colocadas uniformemente na placa inferior com auxílio de uma pipeta plástica e a geometria superior foi abaixada de modo a entrar em contato com a amostra com uma altura de 500  $\mu\text{m}$ . As amostras foram ambientadas nesta temperatura por 3 minutos (min) e então o teste foi iniciado. A viscosidade das amostras foram avaliadas a uma taxa de cisalhamento de 10  $\text{s}^{-1}$  e uma rampa de temperatura de 5 °C/min na faixa de 5-40 °C.

#### 5.3.2 Avaliação do Tempo de $T_{\text{sol-gel}}$

A determinação do tempo de  $T_{\text{sol-gel}}$  também foi aferida pelo método de inclinação de tubo de ensaio, em que 2,0 mL do HG-QS-P407 (em diferentes concentrações) e HG-P407 (em diferentes concentrações) foi transferido a um tubo de ensaio e mantido em banho-maria a temperatura de 32 °C. A cada 5,0 segundos (s) o tubo de ensaio era removido do banho-maria e inclinado a um ângulo acima de 180° para observar o estado de fluidez das amostras, as formulações que ultrapassaram 40 s e não foi observada a fase de  $T_{\text{sol-gel}}$  foram consideradas inviáveis para uso em aplicação tópica. O tempo de gelificação foi registrado quando houve ausência de fluidez do HG-QS-P407 e/ou HG-P407 no tubo de ensaio, o que caracteriza a mudança da fase solução para a fase gel (Giovagnoli; Tsai; Deluca, 2010; Hani; Bhat; Shivakumar, 2011).

### 5.3.3 Ensaio de Bioadesão *in vitro*

Orelhas suínas frescas de porcos com 6 meses de idade foram obtidas de um abatedouro local e preparadas conforme método descrito por Dick e Scott (1992). As orelhas foram limpas com água ( $25 \pm 0,5$  °C) e as que apresentaram lesões foram descartadas. As peles não danificadas foram removidas da cartilagem com bisturi e a camada contendo estrato córneo e a epiderme foi separada do tecido adiposo com um dermatômetro (Nouvag TCM 300, Goldach, EUA) com uma espessura 400 µm e foi congelada em -20 °C por até 4 semanas.

No dia do experimento, a pele foi descongelada em solução salina fisiológica, contendo 0,9% (p/v) de cloreto de sódio, a  $32 \pm 0,5$  °C por 30 min; em seguida, os pelos foram cortados com tesoura. Analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, England) contendo da sonda cilíndrica (diâmetro de 10 mm) foi utilizado para avaliar a força de destacamento. A sonda cilíndrica foi encapada com fita crepe 101LA (3M<sup>®</sup>) e duas gotas de adesivo à base cianoacrilato (Loctite<sup>®</sup> Super Bonder<sup>®</sup>) e então a pele foi fixada na extremidade inferior da sonda cilíndrica e presa as bordas com um anel de borracha. Os HGs foram colocados abaixo da sonda e imersos em banho-maria a  $32 \pm 0,5$  °C.

O teste foi realizado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mm/s) até que a pele e a amostra fizessem contato, detectado por uma força de disparo de 2 mN. A pele e a amostra foram mantidas em contato por 60 s e nenhuma força foi aplicada neste intervalo. Após 60 s, a pele foi puxada para cima (0,5 mm/s) até que o contato entre as superfícies fosse rompido. Durante o experimento, uma curva força-tempo foi registrada; a partir do qual foi calculado o pico de destacamento. Cinco réplicas foram analisadas a  $32 \pm 0,5$  °C.

### 5.3.4 Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Neste estudo, utilizou-se a espectroscopia na região do infravermelho para determinar a interação dos grupos funcionais dos polímeros utilizados para compor os HGs. A técnica foi desempenhada com o equipamento Vertex 70 da marca Bruker com refletância total atenuada (ATR, em inglês), com resolução espectral de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , 96 scans no intervalo de  $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ . Os componentes isolados (P407 e QS), a mistura física (MF) e a formulação do HG mais atrativa após a análise reológica, foi avaliada. Este estudo também serviu para avaliar a pureza do HG, identificando qualquer composto contaminante na amostra.

### 5.3.5 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As formas e morfologia do HG-QS-P407 foi analisada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), conforme segue em estudos de Zhao *et al.* (2013). O HG-QS-P407 foi congelado com nitrogênio líquido durante 15 min. A seguir, foi liofilizado por 24 h no equipamento Speed Vac. Então, realizaram-se fraturas no material seguido de uma metalização com ouro no equipamento Leica EM SCD 500. A análise deu-se através do MEV (JEOL JSM-7001F).

## 5.4 Ensaios Biológicos

### 5.4.1 Condições de Cultivo Celular

A linhagem celular de melanoma murino B16-F10 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O cultivo celular da B16-F10 foi realizado em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibiótico (penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL)), a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.4.2 TFD Mediada por HG-QS-P407 Contendo Chl<sub>a</sub>

Este estudo foi baseado no protocolo de Morais *et al.* (2021), em que, foram utilizadas microplacas de 96 poços para cultivar as células B16-F10 ( $1 \times 10^4$  por poço). Em seguida, as células foram submetidas ao tratamento com o HG-QS-P407 contendo Chl<sub>a</sub> em diferentes concentrações por aproximadamente 4 h. Após isso, houve o descarte do tratamento e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Por fim, as células foram irradiadas com um Diodo Emissor de Luz (LED, em inglês) (430 nm a 27 J/cm<sup>2</sup>) por aproximadamente 15 min. Após a irradiação, as células foram mantidas no escuro por 24 h em uma incubadora contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.4.3 Ensaios de Viabilidade Celular

Os experimentos de viabilidade celular foram realizados pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). De forma resumida, após 24 h do

tratamento com TFD, as microplacas de 96 poços contendo as células B16-F10 ( $1 \times 10^4$  por poço) receberam MTT a 0,5 mg/mL. Após isso, as microplacas foram incubadas por 2 h a uma temperatura de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o cristal azul escuro de formazan foi dissolvido com DMSO. A leitura das microplacas foi realizada por um espectrofotômetro a uma absorvância de 595 nm, e os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (células tratadas com Sol. Et, Chl\_a livre, e HG-QS-P407). Cada tratamento foi realizado em triplicata e repetido em três experimentos independentes.

### **5.5 Análise Estatística**

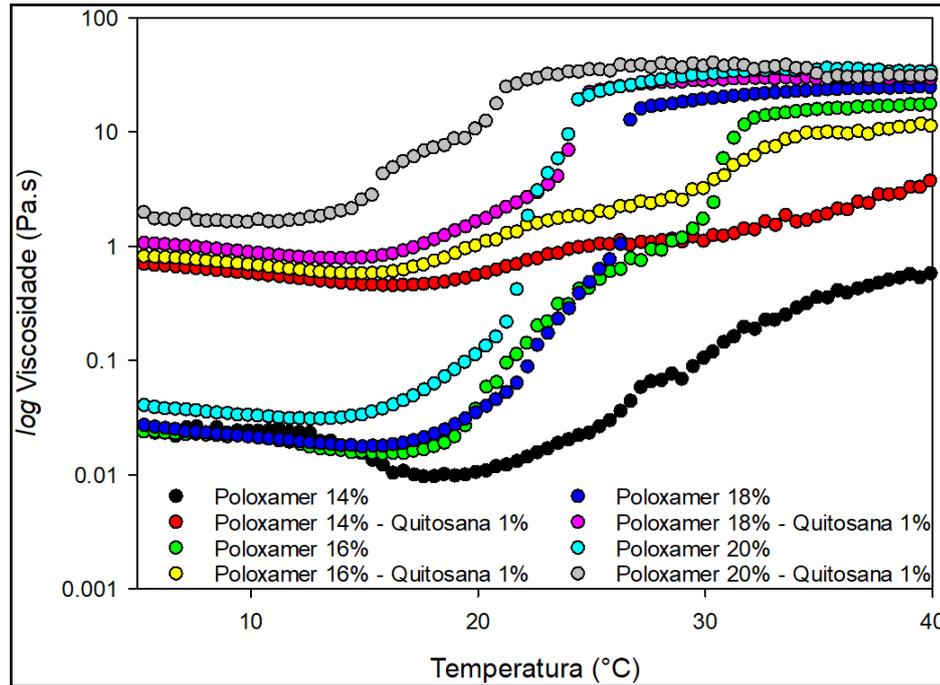
Todos os resultados obtidos nas análises de formulação dos HGs-QS-P407-Chl\_a, foram submetidos à avaliação estatística por meio do *Software GraphPad Prism*, La Jolla, USA, em que, valores com  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Estudos de Caracterização

#### 6.1.1 Avaliação das Propriedades de $T_{\text{sol-gel}}$ das Formulações

Formulações de HGs termossensíveis para aplicações tópicas, preferencialmente devem apresentar uma temperatura de  $T_{\text{sol-gel}}$  próxima à temperatura corporal, entre 25 a 37 °C, pois, nessa faixa de temperatura os HGs possuem características favoráveis, como fácil aplicação corporal, liberação do princípio ativo presente no gel devido à abertura das malhas que se rompem liberando o fármaco sob a lesão-alvo, e o aumento do tempo de permanência do fármaco no local aplicado devido à baixa fluidez. Outra característica importante a ser ressaltada é que nessas temperaturas (25-37 °C) os HGs se comportam como líquido permitindo facilmente a aplicação do gel à temperatura corporal do paciente (Campanholi *et al.*, 2018). Além disso, formulações que apresentam temperatura de  $T_{\text{sol-gel}}$  igual ou superior a 40 °C irá permanecer em forma de solução o que inviabiliza o biomaterial para aplicação tópica (Shelke *et al.*, 2015). Nesse sentido, avaliou-se a temperatura de  $T_{\text{sol-gel}}$  obtida dos HGs-QS-P407 em diferentes concentrações através de análises reológicas. A formulação contendo P407 a 16% apresentou resultados atrativos de temperatura de  $T_{\text{sol-gel}}$  para aplicação tópica, em que essa mudança de fase ocorreu a uma faixa próxima de 32 °C conforme pode ser observado na Figura 8, estando em conformidade com a literatura para formulações de biomateriais com finalidade em aplicações tópicas (Campanholi *et al.*, 2018). Portanto, HGs termossensíveis devem iniciar essa fase de  $T_{\text{sol-gel}}$  na faixa de temperatura de 30 a 37 °C, pois isso garante que o biomaterial esteja na viscosidade ideal para a aplicação na pele do paciente (Campanholi *et al.*, 2018).



**Figura 8.** Viscosidade das amostras de HGs em função da temperatura. Nota: No eixo X representam à faixa de temperatura da fase de  $T_{sol-gel}$  e no eixo Y as informações de viscosidade (Pa.s). Além disso, a cor preta, verde, azul e azul claro representa HGs apenas com P407 em diferentes concentrações e a cor vermelha, amarela, roxa e cinza representa HGs à base de QS e P407 em diferentes concentrações.

Ainda nessa direção, observa-se que as formulações dos HGs à base de QS e P407 tiveram um aumento significativo em sua viscosidade se comparadas com as amostras de HGs contendo apenas P407, como pode ser observado na Tabela 4. Dados semelhantes também foram obtidos por Tuğcu-Demiröz (2017). Além disso, observa-se que quanto mais elevada à temperatura, maior é a viscosidade das amostras, o que favorece o uso dos HGs em aplicações tópicas a temperaturas entre 25 e 37 °C, obtendo-se maior resistência de fluidez do biomaterial o que diminui o escoamento na superfície da pele. Em outras palavras, quanto maior for à viscosidade do HG, menor será a velocidade de fluidez.

**Tabela 4.** Dados de *on set* da temperatura de  $T_{sol-gel}$  dos hidrogéis.

Amostra	Viscosidade em 5° C (Pa.s)	Viscosidade em 20° C (Pa.s)	Viscosidade em 32° C (Pa.s)	Temperatura transição (°C)
HP14	0,023	0,010	0,018	24,5
HP14Q	0,691	0,581	1,634	18,1
HP16	0,023	0,037	13,245	19,0 - 31,74
HP16Q	0,810	1,005	6,207	16,73 - 34,46
HP18	0,026	0,035	21,306	18,6 - 26,7
HP18Q	1,070	1,638	29,437	15,81 - 24,2
HP20	0,040	0,111	34,280	14,43 - 24,90

HP20Q	1,755	10,589	35,106	14,44 - 22,64
-------	-------	--------	--------	---------------

Nota: (HP14) Hidrogel de poloxamer 407 a 14%; (HP14Q) Hidrogel de poloxamer 407 a 14% contendo quitosana a 1%; (HP16) Hidrogel de poloxamer 407 a 16%; (HP16Q) Hidrogel de poloxamer 407 a 16% contendo quitosana a 1%; (HP18) Hidrogel de poloxamer 407 a 18%; (HP18Q) Hidrogel de poloxamer 407 a 18% contendo quitosana a 1%; e (HP20) Hidrogel de poloxamer 407 a 20%; (HP20Q) Hidrogel de poloxamer 407 a 20% contendo quitosana a 1%.

Outro ponto a ser discutido é o tempo de gelificação das formulações de HGs, em que formulações contendo QS (1%) tiveram melhor desempenho na fase de tempo de  $T_{sol-gel}$  em comparação aos HGs apenas com P407, onde apenas a amostra F1.A apresentou tempo de gelificação inferior a 40 s (Tabela 5). Isso mostra que a adição de QS diminui o tempo de gelificação dos HGs de P407, acelerando a formação e associação de micelas na obtenção do gel. Esses resultados são essenciais para avaliar o tempo de gelificação dos HGs e impedir que haja vazamento nos primeiros momentos de aplicação *in situ* do gel no paciente.

**Tabela 5.** Tempo da fase de  $T_{sol-gel}$  dos HG-QS-P407 e HGs-P407.

Identificação	QS (%)	P407 (%)	Tempo (s)
F1	1,0	14	10,24
F2	1,0	16	10,20
F3	1,0	18	10,23
F4	1,0	20	N/A
F1.A	N/A	14	30,12
F2.B	N/A	16	N/A
F3.C	N/A	18	N/A
F4.D	N/A	20	N/A

Nota: (QS) Quitosana; (P407) Poloxamer 407; (F1) Frasco 1; (F2) Frasco 2; (F3) Frasco 3; (F4) Frasco 4; (F1.A) Frasco 1A; (F2.B) Frasco 2B; (F3.C) Frasco 3C; (F4.D) Frasco 4D; (N/A) Não aplicável; (%) porcentagem; (S) segundos.

No entanto, é necessário entender como ocorre à formação dos géis. Géis poliméricos possuem estruturas tridimensionais formadas por polímeros reticulados que, quando em contato com solventes específicos se expandem em volume. Isso ocorre por causa das forças intramolecular e intermolecular, como ligações covalentes (imprevisíveis), emaranhamento físico, ligações iônicas, força de Van der Waals ou interações hidrofóbicas (Shibayama; Tanaka, 1993; Carvalho *et al.*, 2013).

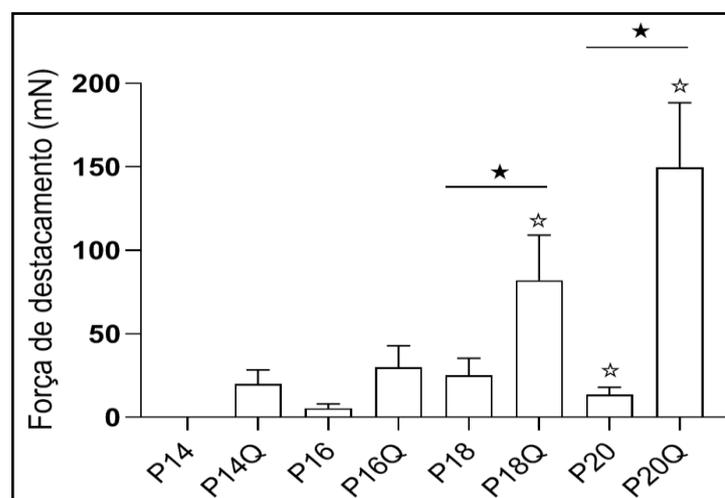
Desse modo, géis de P407 são conhecidos por exibir propriedades de gelificação *in situ* devido ao seu coeficiente de solubilidade negativo para formar micelas de copolímero em bloco a uma determinada temperatura. Esse aumento da temperatura faz com que haja a formação de micelas por meio da desidratação das cadeias dos blocos hidrofóbicos de PPO o

que forma um espaço no centro interno do gel. Em seguida também desidrata a superfície das cadeias de PEO, o que faz com que essas micelas se agreguem e provoque a formação do gel (Devi *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2014).

### 6.1.2 Estudo de Bioadesão *in vitro*

Avaliou-se a capacidade de bioadesão dos HGs-QS-P407 e HGs-P407 em ensaios *in vitro*. Essa avaliação é essencial porque sistemas bioadesivos, como carreadores de fármacos, possuem a capacidade de prolongar o tempo de liberação do princípio ativo no local de aplicação, o que favorece a permanência do fármaco na lesão por mais tempo reduzindo a frequência de novas aplicações do gel no paciente, além de facilitar a adesão do paciente ao tratamento (Carvalho *et al.*, 2010). Sendo assim, torna-se um biomaterial atrativo em aplicações dérmicas, pois outros biomateriais como cremes, soluções e loções não possuem efeito prolongado após a aplicação tópica, uma vez que eles podem ser removidos com facilidade por movimentos físicos do paciente, umidade e temperatura (Shin *et al.*, 2003).

Assim, os HGs-QS-P407 em diferentes concentrações obtiveram resultados de bioadesão atrativos clinicamente, conforme pode ser observado na Figura 9, em que, o gel que necessitou de maior força de deslocamento (mN) aplicado foi o HG de P407 a uma concentração de 20% contendo QS a 1% (m/v) e o segundo melhor desempenho foi obtido pelo HG de P407 a uma concentração de 18% contendo QS a 1% (m/v), seguido do HG de P407 a uma concentração de 16% contendo QS a 1% (m/v), sendo necessária uma força de rompimento entre o gel e a pele de 100 e 50 mN, respectivamente (Figura 9).



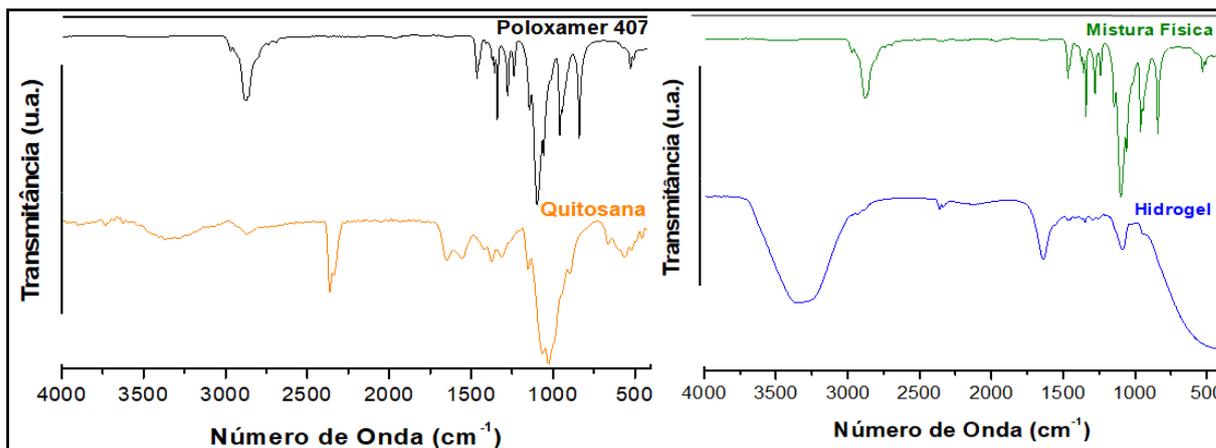
**Figura 9.** Gráfico de barras da força de deslocamento exibidas pelas amostras. Nota: Símbolos: diferenças entre grupos,  $p < 0,05$  (★); comparação com P18Q,  $p < 0,05$  (☆).

Um ponto importante observado, é que os HGs contendo QS possuem capacidade bioadesiva maiores do que os HGs contendo apenas P407, isso mostra que o aumento da bioadesão está relacionado com a adição da QS na formulação do gel. Observa-se a QS atuando numa resposta mais alta, tanto em relação ao trabalho gerado de bioadesão, quanto à força de destacamento. No entanto, o gel livre apresenta uma taxa considerável da força de destacamento, em que, conforme há um aumento mínimo da concentração de P407 no HG (livre) há um aumento da bioadesão como observado em P14, P16 e P18 (Figura 9), sendo que P20 apresentou menor força de destacamento que P18, mesmo com sua concentração maior de P407. Isso mostra que concentrações intermediárias (14, 16 e 18%) de P407 ocasionam aumento significativo da bioadesão e em efeito contrário, com concentração elevada (20%) de P407 não há aumento de bioadesão. Esses resultados estão de acordo com estudos realizado por Cafaggi *et al.* (2005).

Baseado no exposto acima, observa-se que o gel de P407 possui propriedades bioadesivas independentemente de concentrações elevadas de poloxamer, e que, tanto a QS quanto o P407 atuam na formação da matriz bioadesiva (Cafaggi *et al.*, 2005), tendo em vista, que este fenômeno ocorre em um processo de inúmeras etapas como hidratação do polímero, interpenetração do polímero bioadesivo no gel e inchaço das malhas (Pizzi; Mittal, 2017). De forma, que a QS fornece propriedades adesivas para maximizar o contato com a mucosa da pele e após absorver a umidade permitindo a interpenetração do polímero e subsequentemente havendo ligações de hidrogênio. Sugere-se por meio destes resultados, que a combinação do copolímero P407 com a QS resultou em um gel com propriedades bioadesivas promissoras, além da flexibilidade e mobilidade que promove maior interpenetração na mucosa da pele.

### 6.1.3 Caracterização por FTIR-ATR

Após a análise reológica, a amostra HP16Q, que apresentou melhores resultados para aplicação tópica foi submetida à análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, em inglês). A interação de grupos funcionais dos polímeros utilizados para compor o HP16Q foi estudada por ATR. A Figura 10 apresenta os espectros vibracionais dos constituintes do hidrogel (HP16Q), da mistura física e dos componentes separados (P407 e QS).



**Figura 10.** Espectro vibracional na região do infravermelho ( $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) do poloxamer 407, quitosana, mistura física e hidrogel. \*Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

O espectro FTIR do P407 (Figura 10, linha preta) é caracterizado por picos principais de absorção em  $2.877\text{ cm}^{-1}$  do grupo C-H alifático. As bandas presentes em  $1.469\text{ cm}^{-1}$  e  $1.100\text{ cm}^{-1}$  confirmam a presença de grupos C-O característicos de éter, como podem ser observados na Figura 7 referente à estrutura do P407 (Karolewicz *et al.*, 2017). E observa-se também uma banda em  $1.340\text{ cm}^{-1}$  (deformação no plano do O-H).

No espectro da QS (Figura 10, linha laranja), observa-se uma banda de média intensidade alargada na região de  $3.539\text{-}3.110\text{ cm}^{-1}$  que corresponde aos estiramentos de N-H e O-H, além de ligações de hidrogênio intramolecular. A banda próxima de  $2.873\text{ cm}^{-1}$  alargada pode ser atribuída ao estiramento assimétrico do C-H. A presença das bandas em  $1.658\text{ cm}^{-1}$  e  $1.555\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a  $\delta\text{N-H}$ . A deformação do tipo tesoura para o  $\text{CH}_2$  e o estiramento simétrico do  $\text{CH}_3$  foi confirmada pela presença das bandas próxima de  $1.420\text{ cm}^{-1}$  e  $1.376\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. A banda de absorção em  $1.150\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao  $\nu$  assimétrico em ponte de C-O-C. As bandas de absorção em  $1.062\text{ cm}^{-1}$  e  $1.025\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao  $\nu\text{C-O}$ . Todas as bandas observadas no espectro da amostra de QS também foram reportadas por outros autores (Vino *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013). O pico em  $897\text{ cm}^{-1}$  corresponde à deformação fora do plano do C-H do anel de monossacarídeos. As bandas em  $2.359\text{ cm}^{-1}$  e  $2.335\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas à vibração de estiramento assimétrico e simétrico do  $\text{CO}_2$  presente durante a medida (Shimanouchi, 1972).

Observa-se no espectro FTIR da mistura física, Figura 10 (linha verde), a presença tanto de bandas atribuídas a QS quanto ao P407. As bandas em  $2.971\text{ cm}^{-1}$  e  $2.878\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao  $\nu\text{C-H}$  simétrico e assimétrico, respectivamente do  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  presentes nas estruturas do P407 e na QS. A presença da banda de baixa intensidade em  $1.649\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à banda  $\delta\text{N-H}$  presente na QS. As bandas presentes em  $1.100\text{ cm}^{-1}$  e  $1.060\text{ cm}^{-1}$

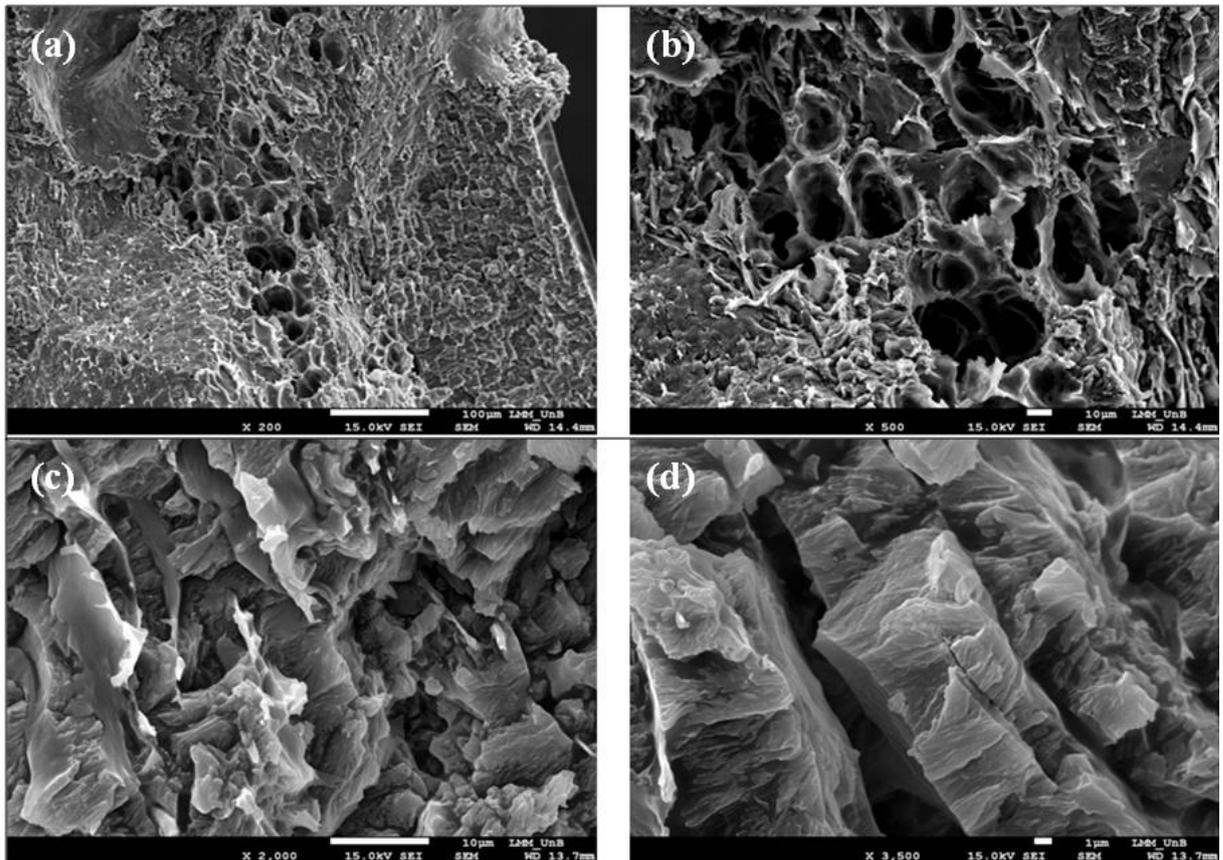
podem ser atribuídas ao  $\nu$ C-O e confirma a presença de grupos C-O-C característico de éter no P407, bem como na QS. Não foi possível observar deslocamentos significativos nas bandas da mistura física, o que permite inferir que houve apenas uma mistura física dos componentes, o que era esperado, uma vez que nessa amostra não foi adicionado água e nem realizado todo o processo de preparo do HG.

No espectro do hidrogel, Figura 10 (linha azul) observa-se uma banda em  $3.328\text{ cm}^{-1}$  intensa e alargada que pode ser atribuída ao  $\delta$ N-H e  $\nu$ O-H, e a ligações de hidrogênio, o que caracteriza uma banda bem alargada (Pavia *et al.*, 2010). Essas ligações de hidrogênio podem ser oriundas do grupo hidroxila do P407 com o N do grupo NH da QS. Por exemplo: as bandas de baixa intensidade em  $2.927\text{ cm}^{-1}$  e  $2.879\text{ cm}^{-1}$  que são características do estiramento simétrico e assimétrico tanto do P407 quanto da QS são observadas no espectro. No espectro observa-se também uma banda de média intensidade e alargada em  $1.642\text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída à banda  $\delta$ N-H presente na quitosana, e esta encontra-se deslocada em  $16\text{ cm}^{-1}$  quando comparada ao espectro da QS, o que é um forte indício que o hidrogel está tendo uma interação via o grupo  $-\text{NH}_2$  da QS. Diante das alterações observadas em bandas características do P407 bem como da QS no espectro do hidrogel que foram citadas acima quando comparado aos espectros do P407 e da QS isolados, sugere-se que esse hidrogel seja formado por interações do tipo de hidrogênio entre o H do grupo  $-\text{OH}$  presente no P407 com o N do grupo  $-\text{NH}_2$  da QS (Vyas *et al.*, 2009). Além disso, não foram identificados quaisquer compostos contaminantes, o que sugere uma pureza da formulação.

#### 6.1.4 Caracterização por MEV

As formas e a estrutura de superfície do HG-QS-P407 em seu estado intumescido foi analisada pela técnica MEV, conforme ilustrado na Figura 11. Observa-se uma estrutura porosa e áspera em seu estado de dispersão (Figuras 11c e 11d). Além disso, observa-se que as estruturas internas transversais exibem um conjunto de poros semelhantes a alvéolos (Figuras 11a e 11b). Essas estruturas de superfícies morfológicas são características específicas em formulações de HGs conforme relatado em estudos de Kim e Chu (2000), que estudaram técnicas de caracterização por MEV de HGs de metacrilato-swollendextran. Nesses estudos eles observaram que os HGs possuíam características distintas quando se encontravam com as malhas abertas e fechadas. Quando abertas, exibiam estrutura porosa e áspera semelhantes às observadas neste estudo com o HG-QS-P407, além de apresentar uma

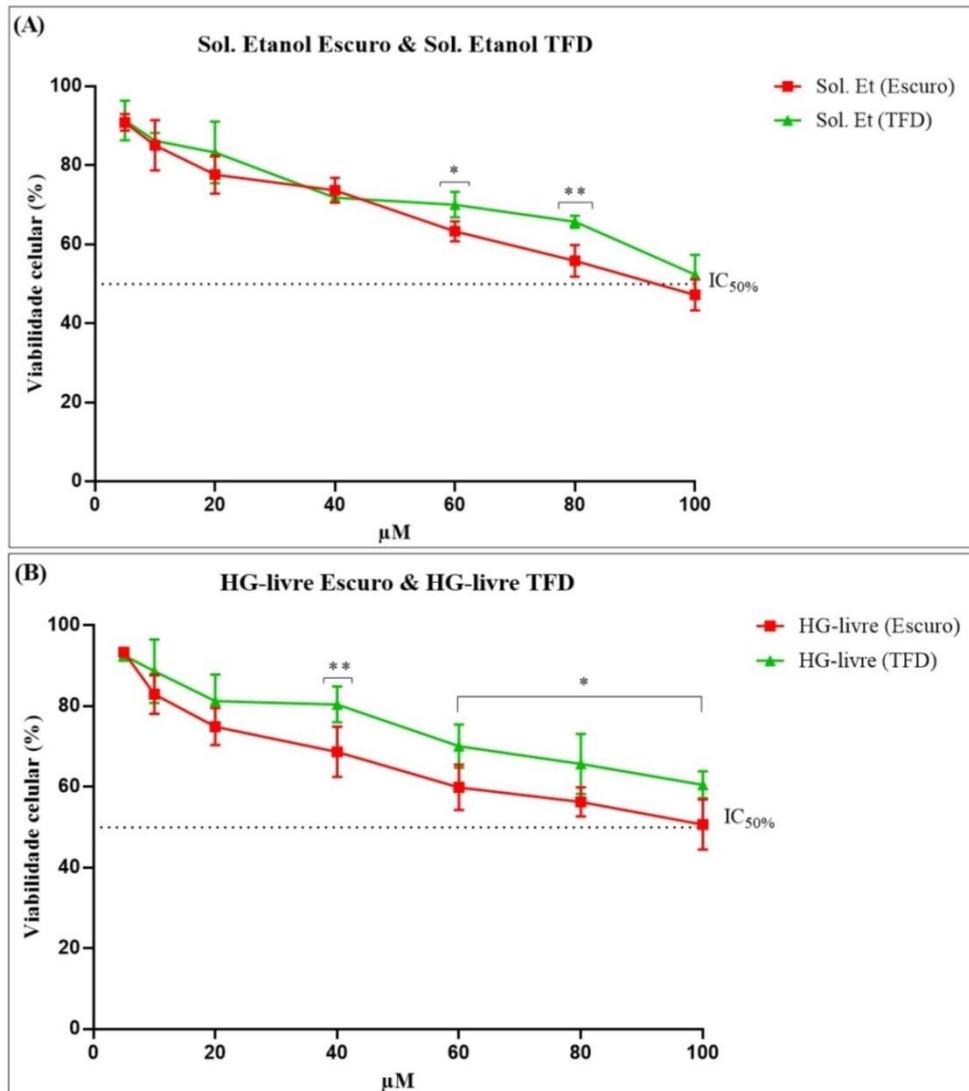
estrutura de superfície e transversal não porosa quando se encontrava com as malhas fechadas.



**Figura 11.** Morfologia de superfície do hidrogel à base de quitosana e poloxamer 407. Nota: (a) e (b) estrutura interna transversal, que exibe poros semelhantes a alvéolos; (c) e (d) estrutura de superfície áspera e com cavidade profunda.

## 6.2 Ensaios biológicos

A formulação HP16Q com as melhores características para aplicação tópica foi selecionada para receber a Chl<sub>a</sub>, na qual foi avaliada sua atividade citotóxica contra células de melanoma murino B16-F10 por meio da TFD *in vitro*. Desse modo, observou-se que os controles (Sol. Et e HG-livre) apresentaram baixa atividade citotóxica quando submetidas à TFD *in vitro*, tendo viabilidade celular acima de 50% mesmo na maior concentração utilizada de 100 µM (Figura 12a). Quando a Sol. Et (2%) é mantida no escuro, é observado um resultado semelhante ao obtido com a Sol. Et (2%) excitada por LED conforme ilustrado na Figura 12a, tendo diferença estatística para as concentrações de 60 e 80 µM, evidenciando que o LED não influencia na indução da morte celular.



**Figura 12.** Atividade citotóxica de soluções de etanol e HGs-livre frente células de melanoma (B16-F10). Nota: (Sol. Et) Solução de Etanol; (HG-livre) Hidrogel; (TFD) Terapia Fotodinâmica; ( $\mu\text{M}$ ) Micromolar; (%) Porcentagem; ( $\text{IC}_{50}$ ) Concentração Inibitória Média. Valores com  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

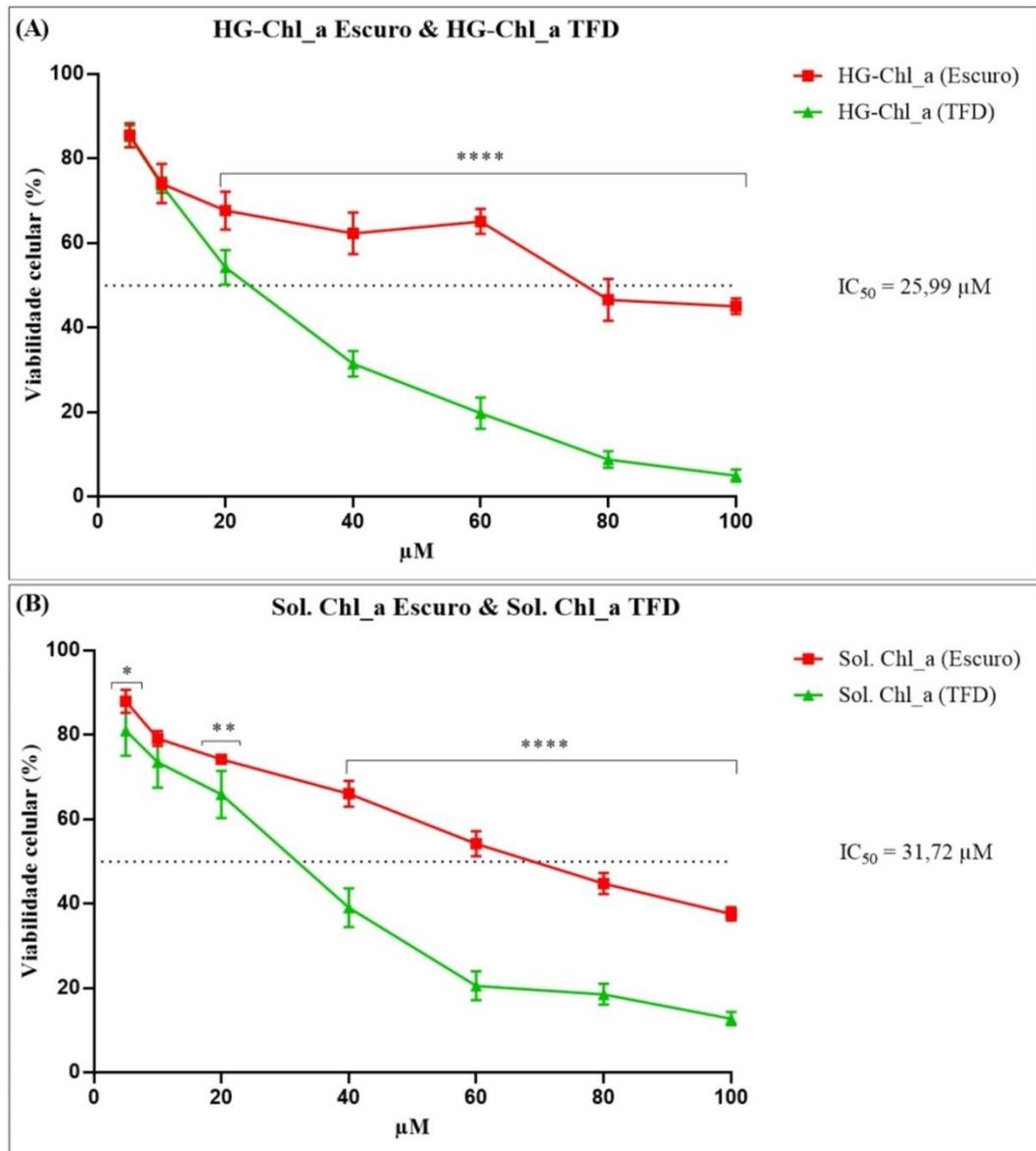
É possível observar uma diferença estatística nas concentrações de 60 e 80  $\mu\text{M}$  das Sol. Et, quando comparado os dois tipos de tratamentos, TFD e escuro. Sendo que essa baixa redução da viabilidade celular não está relacionada à exposição ao LED, tendo em vista que a viabilidade celular é maior quando as células foram expostas à TFD (Figura 12a), o que também foi observado em estudos de Shah *et al.* (2021), em que avaliaram a atividade fotodinâmica de 4 tipos de LEDs quando células cancerosas eram expostas a eles. Além disso, observou-se que os LEDs nos comprimentos de ondas 630 nm (vermelho), 515 nm (verde), e 410-456 nm (azul) não influenciaram na redução da viabilidade celular.

O mesmo comportamento também é observado na Figura 12b, quando as células de melanoma foram submetidas ao tratamento com HG-livre. Observa-se uma diferença

estatística nas concentrações de 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{M}$ , demonstrando que a exposição das células cancerosas ao LED não influencia na viabilidade celular. No entanto, é evidenciada uma leve ação citotóxica dos controles (Sol. Et e HG-livre), mas não significativa, uma vez que essa ação na maior concentração (100  $\mu\text{M}$  de Sol. Et e HG-livre) não inibe a viabilidade das células cancerosas em 50% quando expostas à TFD (Figura 12a e b).

Quando a atividade citotóxica do HG contendo Chl<sub>a</sub> (HG-Chl<sub>a</sub>) frente às células de melanoma foi avaliada, observou-se uma alta ação inibitória sobre a viabilidade celular em ambos os tratamentos, escuro e TFD (Figura 13a). No entanto, essa ação inibitória foi mais intensa quando as células de melanoma foram tratadas com HG-Chl<sub>a</sub> e irradiadas com LED, tendo um  $\text{IC}_{50}$  igual a 25,99  $\mu\text{M}$ , uma concentração bem abaixo do  $\text{IC}_{50}$  de 173,8  $\mu\text{M}$  da CDDP, fármaco padrão, utilizado em tratamentos de melanoma (Morais *et al.*, 2021).

Outro ponto importante observado, é que há uma diferença estatística nas concentrações testadas (20-100  $\mu\text{M}$ ) quando comparado aos tratamentos escuro vs TFD, conforme ilustrado na Figura 13a. Diante desses resultados, permite-se inferir que a ação citotóxica promovida ocorre da excitação do FS Chl<sub>a</sub> pela luz, o que estimula a formação de EROs e induz a morte celular das células de melanoma. Portanto, essa ativação do FS em seu estado tripleto de excitação deve ter um tempo de vida prolongado, podendo interagir com diferentes moléculas circundantes (fotorreação tipo I), ou reagir com oxigênio molecular (fotorreação tipo II) (Machado, 2000), na qual, a ação fotodinâmica atuará nas células de melanoma danificando-as e promovendo desordem na parede celular que provoca danos ao DNA induzindo a morte celular por apoptose (desejada), necrose e/ou autofagia (Mroz *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2012). Observa-se também, que esta ação citotóxica contra células de melanoma está intimamente relacionada com a concentração administrada, quanto maior a concentração utilizada, maior a taxa de inibição da viabilidade celular.



**Figura 13.** Atividade citotóxica de HGs contendo Chl\_a e soluções de Chl\_a frente células de melanoma (B16-F10). Nota: (HG-Chl\_a) Hidrogel contendo Clorofila a; (HG-livre) Hidrogel livre; (TFD) Terapia Fotodinâmica; (µM) Micromolar; (%) Porcentagem; (IC<sub>50</sub>) Concentração Inibitória Média. Valores com P ≤ 0,05 foram considerados estatisticamente diferentes.

Em relação aos resultados obtidos com a solução de Chl\_a (Sol. Chl\_a) frente às células de melanoma, tanto no escuro quanto no tratamento com TFD *in vitro*, é observado que a Chl\_a apresenta atividade citotóxica. No entanto, a atividade citotóxica da Sol. Chl\_a no escuro é baixa se comparada com a atividade citotóxica empregada pela Sol. Chl\_a excitada por LED. Como pode ser observado na Figura 13b, a Sol. Chl\_a no escuro reduz em 50% a viabilidade celular das células de melanoma a uma concentração acima de 70 µM, por outro lado, quando a Sol. Chl\_a é excitada por LED observa-se que o IC<sub>50</sub> é alcançado a uma concentração de 31,72 µM (Figura 13b), isso mostra que a Chl\_a é um excelente FS em TFD com potencial ativo de grande interesse na área médica, como também destacam Gray e

Fullarton (2007), que terapias minimamente invasivas como a TFD são cruciais para a evolução médica dos tratamentos de câncer de pele e que para a eficácia dessa terapia requer um FS com potencial atividade citotóxica, que iniba as células cancerosas e proporcione boa adesão do paciente ao tratamento.

Observou-se também que quando a Chl\_a foi incorporada ao HG houve uma liberação lenta do FS e esta liberação permitiu manter a atividade sob as células de melanoma, diminuindo a viabilidade celular conforme aumentou-se as concentrações como pode ser visto na Figura 13a para HG-Chl\_a (TFD). Por outro lado, na Figura 13b observa-se um comportamento oposto da Sol. Chl\_a (TFD) em que, ao atingir uma concentração de 60  $\mu\text{M}$  a viabilidade celular tende a aumentar. Esse efeito pode ocorrer quando não há uma liberação controlada do fármaco, onde nesses casos a perda da atividade farmacológica sob a lesão é rápida, enquanto sistemas de liberação controlada de fármacos não liberam imediatamente todo o fármaco, fazendo-o de forma gradual e contínua em diferentes momentos e locais, o que aumenta a eficácia do tratamento e aumenta o tempo de ação farmacológica sob a lesão (Pellá *et al.*, 2018; Pellá *et al.*, 2018).

Pelo exposto, pode-se inferir que o sistema termossensível adotado neste estudo proporciona uma liberação sustentada do FS Chl\_a na TFD *in vitro*. No entanto, necessita-se de estudos de liberação controlada de fármaco para obterem-se resultados conclusivos acerca dessa evidência.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formulação do HG à base de QS e P407 mostrou-se eficaz em promover atividade fotodinâmica mediada por Chl<sub>a</sub>. Além disso, apresentou características essenciais para aplicações tópicas, como a temperatura de 34,46 °C da fase de T<sub>sol-gel</sub>, tempo de 10,20 s da fase de T<sub>sol-gel</sub> e força de deslocamento de 50 mN. Todas essas propriedades favoreceram a biodisponibilidade do fármaco, liberação controlada do princípio ativo e aumento do tempo de permanência do FS no local aplicado devido à sua baixa fluidez. Ainda, proporcionou efetividade na TFD *in vitro* em que o FS apresentou alta atividade fotodinâmica com um IC<sub>50</sub> de 25,99 µM, uma redução significativa da viabilidade celular das células de melanoma em comparação ao IC<sub>50</sub> de 173,8 µM da CDDP. Portanto, foi possível evidenciar a efetividade da formulação de um HG à base de QS e P407 como sistema termossensível em aplicações tópicas para a liberação do FS Chl<sub>a</sub> em TFD contra melanoma.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACS - American Cancer Society. Key Statistics for Melanoma Skin Cancer, 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em 06 de Fevereiro de 2021.

Al-Lazikani, B., Banerji, U., & Workman, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 679-692, 2012. <https://doi.org/10.1038/nbt.2284>

Allison, R. R., Cuenca, R. E., Downie, G. H., Camnitz, P., Brodish, B., & Sibata, C. H. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers-a review of applications and outcomes. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, n. 3, p. 205-222, 2005. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00092-X](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00092-X)

Bai, X., Fisher, D. E., & Flaherty, K. T. Cell-state dynamics and therapeutic resistance in melanoma from the perspective of MITF and IFN $\gamma$  pathways. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 9, p. 549-562, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0204-6>

Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S. J., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., ... & Sondak, V. K. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of clinical oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199-6206, 2009. <https://dx.doi.org/10.1200%2FJCO.2009.23.4799>

Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M. L., Guillemin, F., & Barberi-Heyob, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 612-621, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.007>

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. Biochemistry, 5th edition. E-book, 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/>>. Acessado em 27 de julho de 2021.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492s>

Cafaggi, S., Leardi, R., Parodi, B., Caviglioli, G., Russo, E., & Bignardi, G. Preparation and evaluation of a chitosan salt-ploxamer 407 based matrix for buccal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 1, p. 159-169, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.09.019>

Campanholi, K. D. S., Braga, G., da Silva, J. B., da Rocha, N. L., de Francisco, L. M., de Oliveira, E. L., ... & Caetano, W. Biomedical platform development of a chlorophyll-based extract for topic photodynamic therapy: mechanical and spectroscopic properties. **Langmuir**, v. 34, n. 28, p. 8230-8244, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00658>

Caramella, C. M., Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M. C., & Sandri, G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 92, p. 39-52, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.001>

- Carr, S., Smith, C., & Wernberg, J. Epidemiology and risk factors of melanoma. **Surgical Clinics**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005>
- Carvalho, F. C., Bruschi, M. L., Evangelista, R. C., & Gremião, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 1-17, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000100002>
- Carvalho, F. C., Calixto, G., Hatakeyama, I. N., Luz, G. M., Gremião, M. P. D., & Chorilli, M. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, 2013. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.734510>
- Cather, J. C., & Crowley, J. J. Use of biologic agents in combination with other therapies for the treatment of psoriasis. **American journal of clinical dermatology**, v. 15, n. 6, p. 467-478, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40257-014-0097-1>
- Celli, J. P., Spring, B. Q., Rizvi, I., Evans, C. L., Samkoe, K. S., Verma, S., ... & Hasan, T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. **Chemical reviews**, v. 110, n. 5, p. 2795-2838, 2010. <https://doi.org/10.1021/cr900300p>
- Chen, K. G., Leapman, R. D., Zhang, G., Lai, B., Valencia, J. C., Cardarelli, C. O., ... & Gottesman, M. M. Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 18, p.1259-1271, 2009. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp259>
- Chen, Y., Huang, L., Dai, X., Tian, Q., Yu, M., Agheb, M., ... & Wu, H. Facile formation of a microporous chitosan hydrogel based on self-crosslinking. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 47, p. 9291-9299, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7TB02736B>
- Cui, S., Chen, H., Zhu, H., Tian, J., Chi, X., Qian, Z., ... & Gu, Y. Amphiphilic chitosan modified upconversion nanoparticles for in vivo photodynamic therapy induced by near-infrared light. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 4861-4873, 2012. <https://doi.org/10.1039/C2JM16112E>
- Dawes, S. M., Tsai, S., Gittleman, H., Barnholtz-Sloan, J. S., & Bordeaux, J. S. Racial disparities in melanoma survival. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 75, n. 5, p. 983-991, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.06.006>
- De Souza, L. R., Muehlmann, L. A., Dos Santos, M. S. C., Ganassin, R., Simón-Vázquez, R., Joanitti, G. A., ... & Báo, S. N. PVM/MA-shelled selol nanocapsules promote cell cycle arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. **Journal of nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2014. <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0032-x>
- Devi, D. R., Sandhya, P., & Hari, B. V. Poloxamer: a novel functional molecule for drug delivery and gene therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 8, p. 159, 2013.
- Dick, I. P., & Scott, R. C. (1992). Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, n. 8, p. 640-645, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1992.tb05485.x>

Dolmans, D. E., Fukumura, D., & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>

Eggermont, A. M., Spatz, A., & Robert, C. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816-827, 2014. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60802-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60802-8)

El-kamel, A. H. *In vitro* and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. **International journal of pharmaceutics**, v. 241, n. 1, p. 47-55, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00234-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00234-X)

Engelman, J. A., & Settleman, J. Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. **Current opinion in genetics & development**, v. 18, n. 1, p. 73-79, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.01.004>

Fang, D., Nguyen, T. K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A. N., Hotz, S., ... & Herlyn, M. Atumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. **Cancer research**, v. 65, n. 20, p. 9328-9337, 2005. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1343>

Forman, S. B., Ferringer, T. C., Peckham, S. J., Dalton, S. R., Sasaki, G. T., Libow, L. F., & Elston, D. M. Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma?. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 6, p. 1013-1020, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.10.650>

Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K. H., & Pommier, Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. **Cancer research**, v. 62, n. 17, p. 4899-4902, 2002.

Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., & Bastholt, L. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline—Update 2016. **European Journal of Cancer**, v. 63, p. 201-217, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.05.005>

GCO - Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, França: International Agency for Research on Cancer, 2021. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em 05 de Fevereiro de 2021.

Gershenwald, J. E., & Guy, G. P. Stemming the rising incidence of melanoma: calling prevention to action. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 1, p. 1-3, 2016. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv381>

Giovagnoli, S., Tsai, T., & DeLuca, P. P. Formulation and release behavior of doxycycline–alginate hydrogel microparticles embedded into Pluronic F127 thermogels as a potential new vehicle for doxycycline intradermal sustained delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 212-220, 2010. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9361-8>

Grainger, D. W. Connecting drug delivery reality to smart materials design. **International journal of pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 521-524, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.061>

- Gratieri, T., Gelfuso, G. M., Rocha, E. M., Sarmiento, V. H., de Freitas, O., & Lopez, R. F. V. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 2, p. 186-193, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.02.011>
- Gray, J., & Fullarton, G. The current role of photodynamic therapy in oesophageal dysplasia and cancer. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 4, n. 3, p. 151-159, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2007.04.003>
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 2007. <https://doi.org/10.1038/nature05661>
- Gupta, H., Jain, S., Mathur, R., Mishra, P., Mishra, A. K., & Velpandian, T. Sustained ocular drug delivery from a temperature and pH triggered novel in situ gel system. **Drug delivery**, v. 14, n. 8, p. 507-515, 2007. <https://doi.org/10.1080/10717540701606426>
- Guyon, L., Ascencio, M., Collinet, P., & Mordon, S. Photodiagnosis and photodynamic therapy of peritoneal metastasis of ovarian cancer. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 9, n. 1, p. 16-31, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.08.003>
- Hani, U., Bhat, R. S., & Shivakumar, H. G. Formulation design and evaluation of metronidazole microspheres in a bioadhesive gel for local therapy of vaginal candidiasis. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 1, p. 161, 2011.
- Hearing, V. J. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. **Journal of dermatological science**, v. 37, n. 1, p. 3-14, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2004.08.014>
- Hung, M. C., & Lau, Y. K. Basic science of HER-2/neu: a review. **In: Seminars in oncology**. 1999. p. 51-59.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer. Câncer de pele melanoma, 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>>. Acesso em 30 de Maio de 2022.
- Isonishi, S., Saitou, M., Yasuda, M., & Tanaka, T. Mitochondria in platinum resistant cells. **Human Cell**, v. 14, n. 3, p. 203-210, 2001.
- James, W. D., Berger, T. G., & Elston, D. M. Melanocytic Nevi and Neoplasms. **In: Andrews' Diseases of the Skin, Clinical Dermatology**. Chapter 30, USA Saunders-Elsevier, 11th Edition, 2011.
- Jhappan, C., Noonan, F. P., & Merlino, G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3099-3112, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206450>
- Jin, X., Zhang, S. B., Li, S. M., Liang, K., & Jia, Z. Y. Influence of chitosan nanoparticles as the absorption enhancers on salvianolic acid B *In vitro* and *In vivo* evaluation. **Pharmacognosy magazine**, v. 12, n. 45, p. 57, 2016. <https://dx.doi.org/10.4103%2F0973-1296.176047>

Juhasz, J., Lenaerts, V., Raymond, P., & Ong, H. Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible poloxamer gels. **Biomaterials**, v. 10, n. 4, p. 265-268, 1989.  
[https://doi.org/10.1016/0142-9612\(89\)90103-8](https://doi.org/10.1016/0142-9612(89)90103-8)

Kakkar, P., & Madhan, B. Fabrication of keratin-silica hydrogel for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 66, p. 178-184, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.067>

Karolewicz, B. A review of polymers as multifunctional excipients in drug dosage form technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 525-536, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.02.025>

Karolewicz, B., Gajda, M., Górnjak, A., Owczarek, A., & Mucha, I. Pluronic F127 as a suitable carrier for preparing the imatinib base solid dispersions and its potential in development of a modified release dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, n. 1, p. 383-390, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6139-1>

Kato, H., Harada, M., Ichinose, S., Usuda, J., Tsuchida, T., & Okunaka, T. Photodynamic therapy (PDT) of lung cancer: experience of the Tokyo Medical University. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 1, p. 49-55, 2004. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00008-0)

Kelland, L. R. A new resistance mechanism to cisplatin?. **Drug resistance updates**, v. 3, n. 3, p. 139-141, 2000. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0132>

Kiene, K., Porta, F., Topacogullari, B., Detampel, P., & Huwyler, J. Self-assembling chitosan hydrogel: A drug-delivery device enabling the sustained release of proteins. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 1, p. 45638, 2018. <https://doi.org/10.1002/app.45638>

Kim, S., Lee, K. S., & Cho, J. W. Photodynamic therapy combined with cryotherapy for the treatment of nodular basal cell carcinoma. **Oncology letters**, v. 6, n.4, p. 939-941, 2013.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2013.1504>

Kim, S. H., & Chu, C. C. Synthesis and characterization of dextran–methacrylate hydrogels and structural study by SEM. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials**, v. 49, n. 4, p. 517-527, 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(20000315\)49:4%3C517::AID-JBM10%3E3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(20000315)49:4%3C517::AID-JBM10%3E3.0.CO;2-8)

Klouda, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications: A seven-year update. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 338-349, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.017>

Koch, S. E., & Lange, J. R. Amelanotic melanoma: the great masquerader. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 5, p.731-734, 2000.  
<https://doi.org/10.1067/mjd.2000.103981>

Kohler, B. A., Ward, E., McCarthy, B. J., Schymura, M. J., Ries, L. A., Ehemann, C., ... & Edwards, B. K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2007, featuring

tumors of the brain and other nervous system. **Journal of the national cancer institute**, v. 103, n. 9, p. 714-736, 2011. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr077>

Konopka, K., & Goslinski, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of dental research**, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007. <https://doi.org/10.1177%2F154405910708600803>

Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., ... & Getz, G. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. **Nature**, v. 499, n. 7457, p. 214-218, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12213>

Lima-Tenório, M. K., Pineda, E. A. G., Ahmad, N. M., Fessi, H., & Elaissari, A. Magnetic nanoparticles: *In vivo* cancer diagnosis and therapy. **International journal of pharmaceuticals**, v. 493, n. 1-2, p. 313-327, 2015a. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.059>

Lima-Tenório, M. K., Tenório-Neto, E. T., Guilherme, M. R., Garcia, F. P., Nakamura, C. V., Pineda, E. A., & Rubira, A. F. Water transport properties through starch-based hydrogel nanocomposites responding to both pH and a remote magnetic field. **Chemical Engineering Journal**, v. 259, p. 620-629, 2015b. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.045>

Ma, L. W., Nielsen, K. P., Iani, V., & Moan, J. A new method for photodynamic therapy of melanotic melanoma-effects of depigmentation with violet light photodynamic therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 26, n. 3, 2007. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v26.i3.10>

Machado, A. E. D. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, p. 237-243, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000200015>

Maeda, H., Fang, J., Inutsuka, T., & Kitamoto, Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. **Int. Immunopharmacol**, v. 3, p. 319-325, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(02\)00271-0](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(02)00271-0)

Martin II, R. C., Scoggins, C. R., Ross, M. I., Reintgen, D. S., Noyes, R. D., Edwards, M. J., & McMasters, K. M. Is incisional biopsy of melanoma harmful?. **The American journal of surgery**, v. 190, n. 6, p. 927-932, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2005.08.020>

Mignani, S., Bryszewska, M., Klajnert-Maculewicz, B., Zablocka, M., & Majoral, J. P. Advances in combination therapies based on nanoparticles for efficacious cancer treatment: an analytical report. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 1, p. 1-27, 2015. <https://doi.org/10.1021/bm501285t>

Mohammed, M. A., Syeda, J. T., Wasan, K. M., & Wasan, E. K. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 53, 2017. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053>

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. <https://doi.org/10.3402/nano.v5.24381>

- Morachis, J. M., Mahmoud, E. A., & Almutairi, A. Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 3, p. 505-519, 2012. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005363>
- Morais, J. A. V., Almeida, L. R., Rodrigues, M. C., Azevedo, R. B., & Muehlmann, L. A. The induction of immunogenic cell death by photodynamic therapy in B16F10 cells in vitro is effected by the concentration of the photosensitizer. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 35, p. 102392, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102392>
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2516-2539, 2011. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>
- Nagai, H., Oniki, S., Fujiwara, S., Yoshimoto, T., & Nishigori, C. Antimelanoma immunotherapy: clinical and preclinical applications of IL-12 family members. **Immunotherapy**, v. 2, n. 5, p. 697-709, 2010. <https://doi.org/10.2217/imt.10.46>
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R. C., Lee, H., ... & Lo, R. S. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 973-977, 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09626>
- Olivier, K. R., Schild, S. E., Morris, C. G., Brown, P. D., & Markovic, S. N. A higher radiotherapy dose is associated with more durable palliation and longer survival in patients with metastatic melanoma. **Cancer**, v. 110, n. 8, p. 1791-1795, 2007. <https://doi.org/10.1002/cncr.22988>
- O Melanoma. Oncomais. 2015. Disponível em: <http://oncomais.pt/cancro/tiposde-cancro/melanoma>. Acesso em jul. 2022.
- Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M. O., Kelleher, D. P., & Reynolds, J. V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 8, n. 1, p. 14-29, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.12.001>
- Pellá, M. C., Lima-Tenório, M. K., Tenório-Neto, E. T., Guilherme, M. R., Muniz, E. C., & Rubira, A. F. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, p. 233-245, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>
- Pflugfelder, A., Weide, B., Eigentler, T. K., Forschner, A., Leiter, U., Held, L., ... & Garbe, C. Incisional biopsy and melanoma prognosis: Facts and controversies. **Clinics in dermatology**, v. 28, n. 3, p. 316-318, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.06.013>
- Pizzi, A., & Mittal, K. L. (Ed.). **Handbook of adhesive technology**. CRC press, 2017.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. Introdução à espectroscopia: Tradução da 4ª edição norte-americana. **São Paulo: Cengage Learning**, 2010.
- Raposo, G., & Marks, M. S. The dark side of lysosome-related organelles: specialization of the endocytic pathway for melanosome biogenesis. **Traffic**, v. 3, n. 4, p. 237-248, 2002. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.030401.x>

Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R., & Alaibac, M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In vivo**, v. 28, n. 6, p. 1005-1011, 2014.

Saiag, P., Bosquet, L., Guillot, B., Verola, O., Avril, M. F., Bailly, C., ... & Négrier, S. Management of adult patients with cutaneous melanoma without distant metastasis. 2005 update of the French Standards, Options and Recommendations guidelines. Summary report. **European Journal of Dermatology**, v. 17, n. 4, p. 325-331, 2007. <https://doi.org/10.1684/ejd.2007.0209>

Saldanha, G., Potter, L., DaForno, P., & Pringle, J. H. Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies. **Clinical cancer research**, v. 12, n. 15, p. 4499-4505, 2006. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2447>

Scolyer, R. A., Thompson, J. F., Shaw, H. M., & McCarthy, S. W. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized primary cutaneous melanoma. **Journal of cutaneous pathology**, v. 33, n. 5, p. 395-396; author reply 397, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.0303-6987.2006.00452.x>

Shah, E. T., Mesrati, H. A. O., Aldallal, U. J., Abdulwahab, F., Henari, F. Z., & Safrany, S. T. Assessing the photodynamic therapeutic effects of 5-aminolevulinic acid on human colon cancer cells using light-emitting diodes. **World Academy of Sciences Journal**, v. 3, n. 5, p. 1-6, 2021. <https://doi.org/10.3892/wasj.2021.114>

Shelke, S., Shahi, S., Jalalpure, S., Dhamecha, D., & Shengule, S. Formulation and evaluation of thermoreversible mucoadhesive in-situ gel for intranasal delivery of naratriptan hydrochloride. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 29, p. 238-244, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.08.003>

Shibayama, M., & Tanaka, T. Volume phase transition and related phenomena of polymer gels. **Responsive gels: volume transitions I**, p. 1-62, 1993. [https://doi.org/10.1007/3-540-56791-7\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-56791-7_1)

Shimanouchi, T. **Tables of molecular vibrational frequencies**. Washington, DC: National Bureau of Standards, 1972.

Shin, S. C., Lee, J. W., Yang, K. H., & Lee, C. H. Preparation and evaluation of bioadhesive benzocaine gels for enhanced local anesthetic effects. **Int J Pharm** 2003;260:77-81. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00256-4)

Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265-7279, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>

Siegel, R., Naishadham, D. M., & Jemal, A. D. Cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, n. 1, p. 10-29, 2012. <https://doi.org/10.3322/caac.20138>

Song, C., Yu, H., Zhang, M., Yang, Y., & Zhang, G. Physicochemical properties and antioxidant activity of chitosan from the blowfly *Chrysomya megacephala* larvae. **International journal of biological macromolecules**, v. 60, p. 347-354, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.039>

- Sosman, J. A., & Puzanov, I. Molecular targets in melanoma from angiogenesis to apoptosis. **Clinical cancer research**, v. 12, n. 7, p. 2376s-2383s, 2006. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2558>
- Soares, P. A., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., Andrade, C. A., Barros Jr, W., Correia, M. T., ... & Carneiro-da-Cunha, M. G. Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: Pollicaju and chitosan. **Materials Science and Engineering: C**, v. 42, p. 219-226, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.009>
- Souza, C. D. S., Felicio, L. B. A., Ferreira, J., Kurachi, C., Bentley, M. V. B., Tedesco, A. C., & Bagnato, V. S. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. (3-4), p. 207-213, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2009.09.001>
- Spatz, A., Cook, M. G., Elder, D. E., Piepkorn, M., Ruiter, D. J., & Barnhill, R. L. Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas. **European journal of cancer**, v. 39, n. 13, p. 1861-1865, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(03\)00325-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(03)00325-3)
- Streit, N. M., Canterle, L. P., Canto, M. W. D., & Hecktheuer, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300043>.
- Sulaimon, S. S., Kitchell, B. E., & Ehrhart, E. J. Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. **Journal of comparative pathology**, v. 127, n. 2-3, p. 162-168, 2002. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0576>
- Thompson, J. F., Soong, S. J., Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Ding, S., Coit, D. G., ... & Sondak, V. K. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 16, p. 2199-2205, 2011. <https://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.31.5812>
- TUĞCU-DEMİRÖZ, F. Development of in situ poloxamer-chitosan hydrogels for vaginal drug delivery of benzydamine hydrochloride: Textural, mucoadhesive and in vitro release properties. **Marmara pharmaceutical journal**, v. 21, n. 4, p. 762-770, 2017. <https://doi.org/10.12991/mpj.2017.3>
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 57, p. 414-433, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>
- Vyas, V., Sancheti, P., Karekar, P., Shah, M., & Pore, Y. Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. **Acta pharmaceutica**, v. 59, n. 4, p. 453-461, 2009. <https://doi.org/10.2478/v10007-009-0037-4>
- Vino, A. B., Ramasamy, P., Shanmugam, V., & Shanmugam, A. Extraction, characterization and *in vitro* antioxidative potential of chitosan and sulfated chitosan from Cuttlebone of *Sepia aculeata* Orbigny, 1848. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S334-S341, 2012. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60184-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60184-1)

Wagle, N., Emery, C., Berger, M. F., Davis, M. J., Sawyer, A., Pochanard, P., ... & Garraway, L. A. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. **Journal of clinical oncology**, v. 29, n. 22, p. 3085, 2011.

<https://dx.doi.org/10.1200%2FJCO.2010.33.2312>

Watts, C. G., Madronio, C., Morton, R. L., Goumas, C., Armstrong, B. K., Curtin, A., ... & Cust, A. E. Clinical features associated with individuals at higher risk of melanoma: a population-based study. **JAMA dermatology**, v. 153, n. 1, p. 23-29, 2017.

<https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.3327>

WHO - World Health Organization. The global cancer observatory, 2020. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)>. Acesso em 29 de Janeiro de 2021.

Yuan, T. A., Lu, Y., Edwards, K., Jakowatz, J., Meyskens, F. L., & Liu-Smith, F. Race-, age-, and anatomic site-specific gender differences in cutaneous melanoma suggest differential mechanisms of early- and late-onset melanoma. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 6, p. 908, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijerph16060908>

Zhang, G., Wang, L., Cui, H., Wang, X., Zhang, G., Ma, J., ... & Gao, B. Anti-melanoma activity of T cells redirected with a TCR-like chimeric antigen receptor. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014. <https://doi.org/10.1038/srep03571>

Zhang, Y., Zhou, Q., Tian, N., Li, C., & Wang, X. Ru (II)-Complex-based DNA photocleaver having intense absorption in the phototherapeutic window. **Inorganic chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1865-1873, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b02459>

Zhao, B., Yin, J. J., Bilski, P. J., Chignell, C. F., Roberts, J. E., & He, Y. Y. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 241, n. 2, p. 163-172, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.010>

Zhao, Y. Z., Lv, H. F., Lu, C. T., Chen, L. J., Lin, M., Zhang, M., ... & Wong, H. L. Evaluation of a novel thermosensitive heparin-polyoxamer hydrogel for improving vascular anastomosis quality and safety in a rabbit model. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e73178, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073178>