



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**LUCAS FRAGA FRIAÇA ALBUQUERQUE**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS  
NANOESTRUTURADOS CONTENDO IBRUTINIBE PARA O TRATAMENTO  
TÓPICO DE MELANOMA**

BRASÍLIA

2025

Lucas Fraga Friaça Albuquerque

Desenvolvimento e avaliação de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ibrutinibe  
para o tratamento tópico de melanoma

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas da  
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade  
de Brasília, como requisito à obtenção do título  
de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Brasília

2025

Autorizo a publicação e divulgação total ou parcial desse trabalho, por qualquer meio de convencional ou eletônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

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

FL933d Fraga Friaça Albuquerque, Lucas  
Desenvolvimento e avaliação de carreadores lipídicos  
nanoestruturados contendo ibrutinibe para o tratamento  
tópico de melanoma / Lucas Fraga Friaça Albuquerque;  
orientador Guilherme Martins Gelfuso. Brasília, 2025.  
118 p.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de  
Brasília, 2025.

1. melanoma. 2. ibrutinibe. 3. carreadores lipídicos  
nanoestruturados. 4. permeação cutânea. 5. método  
bioanalítico. I. Martins Gelfuso, Guilherme, orient. II.  
Título.

**LUCAS FRAGA FRIAÇA ALBUQUERQUE**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE CARREADORES LIPÍDICOS  
NANOESTRUTURADOS CONTENDO IBRUTINIBE PARA O TRATAMENTO  
TÓPICO DE MELANOMA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Aprovado em 06 de Junho de 2025

---

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Fonseca Vianna Lopez (Examinadora externa)

---

Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto (Examinador externo)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Yris Maria Fonseca Bazzo (Examinadora interna)

---

Prof. Dr. Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho (Examinador suplente)

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus avós, Wilknon da Silveira Friaça e Warley Fraga Friaça, e à minha mãe, Wany Fraga Friaça. Agradeço por todo o incentivo que me deram ao longo da minha formação acadêmica, desde os primeiros anos na escola até a finalização desse trabalho. Esta conquista só foi possível graças ao apoio de vocês e à confiança que sempre depositaram nos meus sonhos e meus planos.

Ao meu esposo, Arthur Fortuna Alves Maciel, por toda a compreensão nos momentos em que foi necessário dedicar tempo (e muito tempo) aos experimentos e à escrita da tese. Obrigado por sempre me apoiar, por sempre ouvir as minhas reclamações e, principalmente, por sempre me incentivar a continuar, apesar das dificuldades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso, por me receber no LTMAC e confiar a mim a realização deste trabalho, mesmo sabendo que eu vinha de uma área de pesquisa distinta e que enfrentaria diversos desafios ao longo do caminho. Obrigado por me orientar ao longo desta trajetória, sempre com muita prontidão. Agradeço também por sempre oferecer as condições materiais e intelectuais necessárias para a realização desta pesquisa. Agradeço aos professores Dr. Marcílio Cunha Filho e Dra. Taís Gratieri pelas contribuições acadêmicas, pelo incentivo, pela confiança e por sempre proporcionarem condições para a realização da pesquisa no LTMAC.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Amanda Malini, Ana Luiza, Geisa e Jaya, por compartilharem conhecimento e por tornarem o laboratório um ambiente leve. Em especial, agradeço também aos meus “irmãos” Breno, Camila, Marianne, Mateus, Mikaella, Luma, Paula e Seila por toda a força que sempre me deram e por todos os momentos vividos dentro e fora do laboratório. Agradeço também à Jessika Rocha, uma das primeiras pessoas a me acolher no LTMAC, por ter me ensinado a produzir CLN e a utilizar o HPLC. Agradeço especialmente também ao Breno, Mateus e Nara, pelo apoio fundamental na etapa final dos experimentos, com o estudo *in vivo*. Agradeço também a todos os colegas que passaram pelo LTMAC e que, de alguma forma contribuíram com este trabalho. Sem o apoio de cada um dos nomes citados aqui, a realização deste trabalho teria sido muito mais difícil.

Ao prof. Dr. Antônio Alonso, da Universidade Federal do Goiás, e à Ellysêssa Nascimento, pela colaboração e auxílio com a realização do estudo EPR.

À professora Dra. Sonia Nair Bao e ao Laboratório de Microscopia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, pelo auxílio na obtenção das fotomicrografias eletrônicas de transmissão.

À professora Dra. Laíse Andrade, Gabriel Farias e ao Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, por todos o apoio técnico e científico, e pelas condições materiais disponibilizadas para a realização do estudo *in vivo*.

À Coordenação de Apoio a Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

E, em especial, à Universidade de Brasília, que levarei para sempre no meu coração como a minha segunda casa ao longo desses 12 anos de formação. Obrigado por me proporcionar uma formação gratuita e por oferecer tantas oportunidades de crescimento, não apenas profissional e acadêmico, mas também pessoal. Espero que esta não seja uma despedida definitiva, mas apenas um “até logo”.

## RESUMO

O melanoma é um tumor maligno que se desenvolve a partir de melanócitos, sendo responsável por mais de 80% das mortes associadas a doenças cutâneas. Apesar dos avanços recentes nos tratamentos clínicos, a resistência medicamentosa, recidivas e a alta toxicidade dos medicamentos justificam a busca por novas abordagens terapêuticas. O ibrutinibe, um inibidor a tirosina quinase de Bruton, tem sido estudado para tumores sólidos e não-sólidos, porém, seu uso oral está associado a baixa biodisponibilidade oral e reações adversas graves. Este estudo propõe o desenvolvimento de uma formulação dermatológica baseada em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) para encapsular o ibrutinibe, como uma alternativa eficaz para o tratamento tópico do melanoma. Inicialmente, foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para detecção e quantificação do ibrutinibe na presença dos contaminantes da pele, demonstrando seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e alta capacidade de recuperação do ibrutinibe das camadas cutâneas (>89%). Após ensaios de análise de calorimetria diferencial exploratória, análise termogravimétrica e ensaio de solubilidade do fármaco em diferentes óleos, dois nanocarreadores distintos foram propostos: CLN1, com óleo de semente de romã na composição (diâmetro médio de  $382,2 \pm 25,3$  nm, PDI de  $0,35 \pm 0,09$  e eficiência de encapsulação de  $91,5 \pm 0,2\%$ ) e CLN2, com ácido oleico (diâmetro médio de  $221,0 \pm 2,6$  nm, PDI de  $0,16 \pm 0,03$  e eficiência de encapsulação de  $96,1 \pm 0,7\%$ ). Ambos apresentaram pH entre 5,7 e 5,9, e não se mostraram irritantes em ensaio HET-CAM. O perfil de liberação mostrou que o CLN2 retardou a liberação do fármaco, enquanto o CLN1 não diferiu do controle. Em estudo de permeação cutânea, CLN1 aumentou a penetração do ibrutinibe para a epiderme nas primeiras horas, enquanto o CLN2 aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a penetração do fármaco após 12 e 24 h de exposição da pele às formulações. A análise espectroscópica de ressonância paramagnética indicou que o CLN2 aumentou a fluidez dos lipídeos presentes no estrato córneo, justificando sua eficácia em tempos prolongados. Dado o seu melhor desempenho, CLN2 foi incorporada a géis de carboximetilcelulose (CMC) em diferentes concentrações, para melhorar as suas características reológicas e viabilizar a aplicação tópica. A formulação contendo 0,25% de CMC (CLN2-gel) apresentou boas características físicas, como diâmetro hidrodinâmico médio e PDI ( $324,1 \pm 4,1$  nm, PDI de  $0,14 \pm 0,03$ ), boas características reológicas, estabilidade e manutenção do perfil de permeação, mesmo com aplicação de massagem. Por fim, CLN2-gel foi avaliado em modelo *in vivo* de melanoma metastático (B16-F10) em camundongos C57BL/6. O tratamento tópico com CLN2-gel retardou o crescimento tumoral em comparação ao placebo. Quando combinado à dacarbazina intraperitoneal, observou-se uma tendência de redução adicional e estabilização do volume tumoral ajustado. Em resumo, o uso de carreadores lipídicos nanoestruturados, especialmente a formulação CLN2-gel, apresenta-se como uma alternativa promissora para o tratamento tópico do melanoma, principalmente como terapia adjuvante às terapias convencionais, sendo esses dados corroborados em modelo experimental de melanoma metastático.

**Palavras-chave:** melanoma, ibrutinibe, carreadores lipídicos nanoestruturados, permeação cutânea, método bioanalítico.

## ABSTRACT

Melanoma is a malignant tumor that develops from melanocytes and is responsible for more than 80% of deaths associated with skin diseases. Despite recent advances in available clinical treatments, drug resistance, relapses, and the high toxicity of drugs, as well as the scarcity of topical treatment options, justify the search for new therapeutic approaches. Ibrutinib, a Bruton's tyrosine kinase inhibitor, has been studied for solid and non-solid tumors. However, its oral use is associated with low oral bioavailability and severe adverse reactions. This study proposes the development of a dermatological formulation based on nanostructured lipid carriers to encapsulate ibrutinib as an effective alternative for the topical treatment of melanoma. Initially, an analytical method using high-performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated for detecting and quantifying ibrutinib in the presence of skin contaminants. The method proved to be selective, sensitive, linear, precise, accurate, and showed high recovery of ibrutinib from skin layers (>89%). After differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis, and solubility studies of the drug in various oils, two distinct nanocarriers were proposed: CLN1, containing pomegranate seed oil (mean diameter of  $382.2 \pm 25.3$  nm, PDI of  $0.35 \pm 0.09$ , and encapsulation efficiency of  $91.5 \pm 0.2\%$ ) and CLN2, using oleic acid (mean diameter of  $221.0 \pm 2.6$  nm, PDI of  $0.16 \pm 0.03$ , and encapsulation efficiency of  $96.1 \pm 0.7\%$ ). Both showed pH values between 5.7 and 5.9 and were non-irritant in the HET-CAM assay. The drug release profile indicated that CLN2 delayed drug release, whereas CLN1 did not differ from the control. In skin permeation studies, CLN1 increased ibrutinib penetration into the epidermis in the initial hours, whereas CLN2 significantly ( $p < 0.05$ ) enhanced drug penetration after 12 and 24 hours of exposure. Electron paramagnetic resonance spectroscopy indicated that CLN2 increased the fluidity of lipids in the stratum corneum, which explains its efficacy over prolonged exposure. Given its superior performance, CLN2 was incorporated into carboxymethylcellulose (CMC) gels at different concentrations to improve rheological properties and enable topical application. The formulation containing 0.25% CMC (CLN2-gel) exhibited favorable physical characteristics, such as hydrodynamic diameter and PDI ( $324.1 \pm 4.1$  nm, PDI  $0.14 \pm 0.03$ ), along with good rheological properties, stability, and maintenance of the permeation profile, even with massage application. Finally, CLN2-gel was evaluated in an in vivo metastatic melanoma model (B16-F10) in C57BL/6 mice. Topical treatment with CLN2-gel delayed tumor growth compared to placebo. When combined with intraperitoneal dacarbazine, an additional reduction and stabilization in adjusted tumor volume were observed. In summary, nanostructured lipid carriers, particularly the CLN2-gel formulation, represent a promising alternative for topical melanoma treatment, especially as an adjuvant therapy to conventional approaches, as demonstrated in a metastatic melanoma experimental model.

**Keywords:** melanoma, ibrutinibe, nanostructured lipid carriers, skin permeation, bioanalytical method.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>7</b>
Representação das camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e as estruturas que a compõe. Autoria própria.	
<b>Figura 2</b>	<b>9</b>
Representação da estrutura e camadas da epiderme: estrato córneo, camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. Autoria própria.	
<b>Figura 3</b>	<b>9</b>
Esquema representativo das vias de permeação cutânea: A) via intracelular; B) via intercelular; C) via transfolicular. Autoria própria.	
<b>Figura 4</b>	<b>12</b>
Representação das classificações clínicas dos melanócitos. Na pele saudável, é possível observar a distribuição dos melanócitos pela camada basal da epiderme. O melanoma de espalhamento superficial é considerado o primeiro estágio do melanoma, com pouca invasão tecidual. Já o melanoma nodular é considerado de grande potencial metastático, com invasão dérmica e infiltração vascular e linfática de células malignas. Autoria própria.	
<b>Figura 5</b>	<b>16</b>
Estrutura química do ibrutinibe. Peso molecular: 440,507 g/mol; pKa: 3,74; logP: 3,97; fórmula molecular $C_{25}H_{24}N_6O_2$ .	
<b>Figura 6</b>	<b>21</b>
Comparação da estrutura básica de (A) nanopartículas lipídicas sólidas e (B) carreadores lipídicos nanoestruturados. Autoria própria.	
<b>Figura 7</b>	<b>26</b>
Esquema representativo da técnica de tape-stripping diferencial. Autoria própria.	
<b>Figura 8</b>	<b>27</b>
Esquema representativo do método de extração utilizado para recuperação do Ibrutinibe das camadas da pele. Autoria própria.	
<b>Figura 9</b>	<b>30</b>
Esquema representativo do processo de contaminação das diferentes camadas da pele com o ibrutinibe e sua extração. Autoria própria.	
<b>Figura 10</b>	<b>33</b>
Representação da técnica de preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Autoria própria.	
<b>Figura 11</b>	<b>36</b>
Representação do protocolo de quantificação do Ibrutinibe total na formulação. Autoria própria.	
<b>Figura 12</b>	<b>37</b>
Representação do protocolo de quantificação do Ibrutinibe livre com dispositivo com tamanho de poro definido. Autoria própria.	
<b>Figura 13</b>	<b>38</b>
Célula de Franz. Autoria própria.	
<b>Figura 14</b>	<b>41</b>

Exposição da membrana cório-alantoide por meio da remoção de uma pequena porção da casca e da membrana da casca do ovo.

**Figura 15** 41

Representação da avaliação in-vitro do potencial irritativo da formulação pela técnica HET-CAM. Autoria própria.

**Figura 16** 44

Representação da avaliação in-vitro do perfil de permeação cutânea com aplicação de massagem. Autoria própria.

**Figura 17** 48

Representação do transplante celular e diagnóstico clínico do melanoma em camundongos. Autoria própria.

**Figura 18** 49

Representação do tratamento tópico, análise por IVIS-Lumina e monitoramento da progressão do melanoma em camundongos. Autoria própria.

**Figura 19** 54

Representação cromatográfica das análises em CLAE do ibrutinibe (7,5 µg/mL) na presença dos contaminantes da pele. IBR: ibrutinibe; EC: estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente.

**Figura 20** 55

Seletividade do método para a quantificação do ibrutinibe. Análise da área do pico (A) e do tempo de retenção (B) do ibrutinibe (7,5µg/mL) isolado e adicionado aos extratos de pele. IBR = ibrutinibe; EC = estrato córneo; FP: folículo piloso; PR: pele remanescente.

**Figura 21** 56

Representação gráfica da curva analítica do ibrutinibe, na faixa de concentração de 0,2 e 15 µg/mL. Equação da reta:  $y = 51226x + 434,65$ ,  $r^2 = 0,9995$ .

**Figura 22** 59

Análise DSC do ibrutinibe, excipientes e das suas respectivas misturas físicas. O pico de fusão e do ibrutinibe está destacado com sombreado cinza. A análise compreende o DSC do ibrutinibe e das misturas físicas do ibrutinibe com os excipientes (linha contínua), comparado com o DSC teórico (linha pontilhada), calculado com base no perfil obtido por cada excipiente individualmente.

**Figura 23** 61

Primeira derivada de TGA do ibrutinibe isolado e das misturas físicas contendo o fármaco e os excipientes selecionados para produção dos nanossistemas. Cada evento de perda de massa está indicado na figura como porcentagem (%) e o TGA obtido por cada mistura física (linhas contínuas) são comparados com o TGA teóricos (linhas pontilhadas), calculados com base no perfil obtido por cada excipiente individualmente.

**Figura 24** 63

Representação da superfície de resposta dos CLN obtidos por diferentes composições e por diferentes métodos de preparo. Dois delineamentos experimentais foram previamente planejados pelo Software Design-Expert versão 12. O primeiro delineamento foi planejado em função da quantidade de cada excipiente na formulação, gerando a superfície de resposta em função do diâmetro médio de partícula em nm (A) e PDI (B). O segundo planejamento foi delineado em função do tempo de agitação em ultra-turrax (min) e tempo de sonicação (min), também gerando superfícies de resposta em função do diâmetro médio de partículas (C) e PDI (D).

**Figura 25** 65

Representação da superfície de resposta dos CLN obtidos por diferentes composições. O delineamento experimental foi previamente planejados pelo Software Design-Expert

versão 12, em função da quantidade de cada excipiente na formulação, gerando a superfície de resposta em função do diâmetro médio de partícula em nm (A) e PDI (B).

**Figura 26** 66

Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das formulações contendo (A) CLN1 e (B) CLN2.

**Figura 27** 67

Representação gráfica do perfil de liberação do ibrutinibe a partir dos carreadores lipídicos nanoestruturados em comparação ao controle com a mesma concentração de fármaco livre em gel. CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

**Figura 28** 68

Representação gráfica da quantificação do ibrutinibe no estrato córneo (A) e na pele remanescente (B) após ensaio de permeação cutânea por 6, 12 e 24 h. CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

**Figura 29** 69

Representação gráfica do ibrutinibe depositado na pele em comparação com o ibrutinibe permeado através da pele após 24 h de tratamento com CLN1, CLN2 e formulação controle (n=5).

**Figura 30** 72

Espectros experimentais (linha preta) e de melhor ajuste (linha vermelha) de sondas de spin 5-DSA, ASL e 5-PC mostradas na figura (A), as quais foram inseridas nas membranas intercelulares do estrato córneo de porcos e ratos neonatos sem e com tratamentos usando quatro formulações. (B) 5-DSA e ASL nas formulações. (C) 5-DSA no estrato córneo de porcos para uma amostra não tratada (controle) e amostras após 30 min de tratamento com as formulações. (D) similar ao mostrado no painel c, mas para a sonda de spin ASL. (e) Espectros experimentais representativos da sonda de spin 5-PC para o estrato córneo hidratado de porcos e ratos antes e depois de 2 h de tratamento com as formulações. (F) similar ao mostrado no painel c, mas para a sonda de spin ASL no estrato córneo de ratos.

**Figura 31** 75

Imagens que demonstram os efeitos observados na membrana cório-alantoide após a aplicação do controle positivo (NaOH 1 mol/L), controle negativo (NaCl 0,9%) e formulações contendo CLN1 e CLN2 após 30 s, 2 min e 5 min de ensaio HET-CAM.

**Figura 32** 76

Dados da caracterização das formulações contendo CLN2 após a incorporação de diferentes concentrações de CMC (0 a 1%) em função do (A) diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e (B) índice de polidispersividade (PDI).

**Figura 33** 77

Representação do diâmetro hidrodinâmico médio dos CLN2 em formulações contendo diferentes concentrações de CMC quando armazenados em temperatura ambiente (A) e temperatura de geladeira (B), durante 90 dias. Representação dos índices de polidispersividade das mesmas formulações armazenadas em temperatura ambiente (C) ou armazenadas sob refrigeração (D).

**Figura 34** 79

Reogramas das curvas ascendentes e descendentes da tensão de cisalhamento (stress) em função do gradiente de cisalhamento (shear rate) das formulações a 25°C (A) e 32°C (C). Reogramas das curvas ascendentes e descendentes da viscosidade aparente (viscosity) em função do gradiente de cisalhamento das formulações a 25°C (B) e 32°C (D). As curvas ascendentes são representadas pelos símbolos fechados e as curvas descendentes pelos símbolos abertos.

**Figura 35** 82

Representação gráfica da quantificação do ibrutinibe no estrato córneo (A) e na pele remanescente (B) após exposição da pele às formulações contendo CLN2 ou CLN2-gel por 6, 12 e 24 h. CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

**Figura 36** 83

Representação gráfica do ibrutinibe depositado na pele em comparação com o ibrutinibe permeado através da pele após 24 h de tratamento com CLN2 e CLN2-gel (n=5).

**Figura 37** 84

Representação gráfica da quantificação do ibrutinibe no estrato córneo (A) e na pele remanescente (B) após exposição da pele às formulações contendo CLN2 por 6, 12 e 24 h, com ou sem a aplicação de massagem no início do experimento. CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

**Figura 38** 85

Representação gráfica do ibrutinibe depositado na pele em comparação com o ibrutinibe permeado através da pele após 24 h de tratamento com CLN2, com ou sem aplicação de massagem no início do experimento (n=5).

**Figura 39** 86

Representação gráfica da quantificação do ibrutinibe no estrato córneo (A) e na pele remanescente (B) após exposição da pele às formulações contendo CLN2-gel por 6, 12 e 24 h, com ou sem a aplicação de massagem no início do experimento. CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

**Figura 40** 88

Representação gráfica do ibrutinibe depositado na pele em comparação com o ibrutinibe permeado através da pele após 24 h de tratamento com CLN2-gel, com ou sem aplicação de massagem no início do experimento (n=5).

**Figura 41** 89

Representação do diagnóstico clínico do melanoma B16-F10 em camundongos da linhagem C57BL/6.

**Figura 42** 90

Representação gráfica da evolução tumoral, expressa pelos volumes tumorais normalizados dos grupos: A) tratado com placebo por via tópica (vermelho), tratados com dacarbazina intraperitoneal (roxo) e tratados com ibrutinibe por via oral (preto); B) placebo tópico (vermelho), tratados com gel contendo ibrutinibe livre por via tópica (verde) e tratados com CLN2-gel tópico (azul); C) tratados com CLN2-gel tópico (azul) e ibrutinibe oral (preto); D) tratados com dacarbazina intraperitoneal (roxo) e tratados com terapia combinada, composta de CLN2-gel tópico e dacarbazina intraperitoneal (azul claro). Os volumes tumorais foram calculados ao longo do tempo (dias) e normalizados pelo volume tumoral no dia do diagnóstico clínico do melanoma, para cada camundongo.

**Figura 43** 92

Representação gráfica do volume tumoral normalizado ao final do 13º após o transplante celular.

**Figura 44** 96

Registro fotográfico dos tumores nos diferentes momentos do experimento: no dia do diagnóstico clínico (coluna esquerda), no dia da eutanásia (coluna central) e após a excisão do tumor (coluna direita). As imagens correspondem aos grupos: não-tratados (A), tratados com dacarbazina (B), tratados com ibrutinibe por via oral (C), tratados com CLN2-gel tópico (D), tratados com gel simples contendo ibrutinibe disperso para aplicação tópica (E) e tratados com terapia combinada de dacarbazina e CLN2-gel (F).

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	<b>31</b>
Resumo da composição das misturas físicas do ibrutinibe e dos excipientes para avaliação da compatibilidade térmica das formulações.	
<b>Tabela 2</b>	<b>34</b>
Resumo da quantidade dos excipientes selecionados para o desenvolvimento do CLN1.	
<b>Tabela 3</b>	<b>35</b>
Resumo da quantidade dos excipientes em mg selecionados para desenvolvimento do CLN2.	
<b>Tabela 4</b>	<b>42</b>
Classificação do grau de irritabilidade das formulações no ensaio de HET-CAM.	
<b>Tabela 5</b>	<b>47</b>
Grupos experimentais para avaliação do efeito terapêutico de CLN2-gel em camundongos com melanoma.	
<b>Tabela 6</b>	<b>52</b>
Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método CLAE-UV para detecção e quantificação do ibrutinibe.	
<b>Tabela 7</b>	<b>57</b>
Precisão do ibrutinibe, mensurada pela repetibilidade e precisão intermediária. CV – coeficiente de variação.	
<b>Tabela 8</b>	<b>57</b>
Valores de recuperação do ibrutinibe do estrato córneo, folículo piloso e da pele remanescente por extração etanólica após 24 h em agitação. CV – coeficiente de variação.	
<b>Tabela 9</b>	<b>80</b>
Resultados de viscosidade das formulações a base de CLN2 contendo carboximetilcelulose nas concentrações de 0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%, nas temperaturas de 25°C e 32°C, durante as curvas ascendente e descendente.	

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BCR	receptor de célula B
BLK	Quinase de linfócitos B
BRAF	Fator de crescimento rápido de tumores do tipo B
BTK	Tirosina quinase de Bruton
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
CTLA4	Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EGRF	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos
ICH	<i>International Conference of Harmonisation</i>
JAK3	Quinase Janus 3
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEK	Quinase de proteína regulada por mitógeno
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NRAS	Neuroblastoma Ras proto-oncogene
PD1	Proteína 1 de morte celular programada
PDGRF	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDI	Índice de polidispersão
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-quinase associado a proteína quinase B
RE	Registro especial
RPM	Rotações por minuto
TGA	Termogravimetria
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
2.1. Objetivo geral.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	6
3.1. A pele e vias de permeação cutânea.....	7
3.2. Melanoma: epidemiologia e classificação.....	10
3.3. Tratamentos e desafios terapêuticos para melanoma.....	13
3.4. Ibrutinibe.....	15
3.5. Nanotecnologia.....	18
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	23
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
5.1. Material.....	27
5.2. Preparo das soluções estoques de ibrutinibe.....	27
5.3. Obtenção da pele suína.....	28
5.4. <i>Tape stripping</i> diferencial.....	28
5.5. Método analítico.....	29
5.5.1. Condições cromatográficas.....	29
5.5.2. Seletividade.....	30
5.5.3. Linearidade.....	30
5.5.4. Limite de detecção e limite de quantificação.....	30
5.5.5. Precisão.....	31
5.5.6. Exatidão.....	31
5.6. Análise térmica e teste de solubilidade.....	32
5.7. Desenvolvimento das nanoformulações.....	34
5.8. Caracterização das nanoformulações.....	38
5.9. Estudos <i>in vitro</i> de liberação.....	39
5.10. Estudos <i>in vivo</i> de permeação em pele suína.....	40
5.11. Determinação das interações entre os CLN e o estrato córneo.....	41
5.12. Ensaio <i>in vitro</i> em membrana cório-alantoide de ovos de galinhas embrionados (HET-CAM) .....	42
5.13. Incorporação do CLN2 em géis fluidos e caracterização.....	44

5.14.	Estudo de estabilidade dos sistemas de géis fluidos.....	44
5.15.	Análise reológica de cisalhamento contínuo dos sistemas de géis fluidos.....	45
5.16.	Estudo <i>in vitro</i> de permeação cutânea do gel fluido contendo CLN2, com e sem massagem.....	45
5.17.	Estudo <i>in vivo</i> do efeito de CLN2-gel no tratamento de melanoma em camundongos C57BL/6.....	46
5.17.1.	Cultura celular e camundongos.....	47
5.17.2.	Transplante das células B16-F10 e avaliação do efeito terapêutico de CLN2-gel em camundongos com melanoma.....	47
5.18.	Análise estatística.....	51
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
6.1.	Estabelecimento das condições cromatográficas .....	54
6.1.1.	Seletividade.....	55
6.1.2.	Linearidade.....	57
6.1.3.	LD e LQ.....	58
6.1.4.	Precisão.....	58
6.1.5.	Exatidão.....	58
6.2.	Análise térmica.....	59
6.3.	Obtenção e caracterização dos CLN.....	64
6.3.1.	CLN obtido com óleo de semente de romã.....	64
6.3.2.	CLN obtido com ácido oleico.....	65
6.4.	Análise morfológica.....	67
6.5.	Avaliação <i>in vitro</i> da liberação do ibrutinibe.....	67
6.6.	Avaliação <i>in vitro</i> da permeação cutânea.....	69
6.7.	Dinâmica molecular dos carreadores lipídicos.....	71
6.8.	Ensaio <i>in vitro</i> em membrana cório-alantoide de ovos de galinhas embrionados (HET-CAM).....	74
6.9.	Incorporação do CLN2 em gel-fluido.....	75
6.10.	Estudo de estabilidade dos géis fluidos.....	76
6.11.	Análise reológica de cisalhamento contínuo dos sistemas de géis fluidos.....	78
6.12.	Estudo <i>in vitro</i> de permeação cutânea de gel fluido contendo CLN2, com e sem massagem.....	81

6.13. Avaliação <i>in vivo</i> do efeito terapêutico de CLN2-gel em camundongos com melanoma B16-F10.....	88
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>98</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>
<b>9. ANEXO 1 – Declaração do Comitê de Ética no uso Animal (CEUA).....</b>	<b>113</b>
<b>10. ANEXO 2 – Depósito de patente.....</b>	<b>114</b>
<b>11. ANEXO 3 – Artigos publicados.....</b>	<b>115</b>
<b>12. ANEXO 4 – Capítulo de livro publicado.....</b>	<b>118</b>

# 1. INTRODUÇÃO

---

O câncer de pele engloba uma ampla variedade de malignidades cutâneas que se originam de diferentes tipos celulares em várias camadas da pele<sup>1</sup>. O melanoma é um tipo específico de câncer de pele que se desenvolve a partir de melanócitos<sup>2</sup>, células localizadas na camada basal da epiderme responsáveis pela produção de melanina para os queratinócitos<sup>3,4</sup>. Embora o melanoma represente de 1% a 5% dos cânceres de pele, é responsável por mais de 80% das mortes associadas a doenças cutâneas<sup>5</sup>, causando, apenas em 2020, mais de 57.000 mortes em todo o mundo<sup>6</sup>.

A introdução de estratégias baseadas em terapia direcionada, como o dabrafenib, representou um marco significativo no tratamento do melanoma. Essas estratégias buscam alvos moleculares envolvidos especificamente no crescimento tumoral, minimizando os danos às células saudáveis. No entanto, apesar de proporcionar melhora clínica, alguns pacientes desenvolvem resistência ao medicamento, recidiva e progressão da doença. Para enfrentar esse desafio, terapias combinadas com inibidores de *checkpoint* imunológico têm sido investigadas<sup>7-9</sup>, mas ainda não oferecem cura para a maioria dos pacientes<sup>9</sup> e podem levar a reações adversas graves em uma proporção significativa de pessoas em tratamento<sup>10-12</sup>. Por isso, apesar dos avanços, a ressecção local permanece como principal opção de tratamento clínico, viável apenas para pacientes nos estágios iniciais da doença, com prognóstico ruim e alta probabilidade de recorrência<sup>13</sup>.

Toda essa situação observada no tratamento do melanoma se contrasta com os avanços terapêuticos em outros cânceres, como tumores sólidos e onco-hematológicos, com o uso do inibidor de tirosina quinase ibrutinibe<sup>14</sup>. O ibrutinibe é um inibidor que visa principalmente a tirosina quinase de Bruton (BTK), especificamente no aminoácido Cys 481 no domínio de ligação ao ATP<sup>15,16</sup>. No entanto, o ibrutinibe também pode se ligar a outras proteínas quinases que possuem o mesmo resíduo de cisteína, como aos receptores dos fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGRF), crescimento epidérmico (EGRF) e crescimento de fibroblastos (FGFR), bem como quinase de linfócitos B (BLK) e quinase Janus 3 (JAK3)<sup>17,18</sup>. Essa ampla gama de alvos do ibrutinibe motivou investigações sobre seu mecanismo de ação em diversos modelos, como no câncer esofágico, pulmonar, hepático<sup>7,19</sup> e no câncer de mama<sup>18</sup>.

Apesar da eficácia do ibrutinibe no tratamento do câncer, sua toxicidade pode levar à redução da dose ou à interrupção do uso<sup>20</sup>. Os principais efeitos adversos associados ao uso sistêmico do ibrutinibe incluem fibrilação atrial, hemorragias, hipertensão, mialgia, anemia, infecções e diarreia, alguns persistindo mesmo após a interrupção do tratamento<sup>21</sup>. Além das reações adversas, a administração do ibrutinibe enfrenta desafios devido à sua baixa

solubilidade e extenso efeito de primeira passagem<sup>22,23</sup>. Por isso, os medicamentos orais são formulados com altas doses, o que aumenta a ocorrência dos efeitos adversos mencionados<sup>24,25</sup>.

Tendo em vista a localização do melanoma, a sua administração tópica poderia ser uma alternativa para reduzir ou eliminar as reações adversas associadas à administração oral. Essa abordagem tem se mostrado eficaz na liberação de certos agentes quimioterápicos a tumores cutâneos<sup>26</sup>. Entretanto, além da dificuldade em quantificar o ibrutinibe nos modelos de pele<sup>27</sup>, há o desafio de desenvolver uma formulação dermatológica que assegure a absorção percutânea do fármaco a níveis terapêuticos nos locais onde os tumores estão localizados<sup>28</sup>. Devido à lipofilicidade do ibrutinibe<sup>29</sup>, sua permeação através do estrato córneo, também muito lipofílico para a retenção de concentrações terapêuticas no melanoma, localizado nas camadas mais profundas da epiderme e derme superior, pode ser desafiadora<sup>30</sup>.

Este trabalho propõe o uso de nanocarreadores lipídicos para encapsular o fármaco e tentar promover a sua liberação para a epiderme viável e derme superior. Dentre os tipos de carreadores nanoestruturados estudados para serem incorporados a formulações farmacêuticas, os sistemas à base de lipídeos destacam-se pela alta biocompatibilidade e adequação para aplicação tópica<sup>31,32</sup>. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são particularmente relevantes nesse contexto, sendo compostos por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos dispersos em uma fase aquosa contendo tensoativos. Essa configuração permite uma suspensão coloidal de partículas sólidas com dimensões entre 10 a 1000 nm, possibilitando um melhor controle da liberação do fármaco, permeação aprimorada e estabilidade física da formulação<sup>32,33</sup>. Além disso, os lipídeos presentes nesses nanossistemas podem interagir com a combinação de ceramidas e ácidos graxos presentes no estrato córneo, gerando um efeito oclusivo e aumentando a fluidez dos lipídeos, o que, por sua vez, influencia a permeação do fármaco através do estrato córneo<sup>34</sup>.

Com base no contexto apresentado, esse trabalho propôs o desenvolvimento, caracterização e avaliação de dispersões aquosas baseadas em carreadores lipídicos nanoestruturados encapsulando o ibrutinibe com o objetivo de obter uma alternativa promissora para o tratamento tópico dos melanomas.

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar dispersões aquosas a base de CLN contendo o ibrutinibe visando a uma abordagem terapêutica tópica eficiente e segura para o tratamento de melanomas.

## 2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico rápido, sensível e confiável capaz de detectar e quantificar o ibrutinibe na presença de interferentes de pele suína para dar suporte a ensaios de permeação cutânea;
- Analisar a compatibilidade físico-química entre o ibrutinibe e os componentes selecionados para o desenvolvimento das formulações;
- Desenvolver dispersões aquosas a base de CLN para incorporar o ibrutinibe;
- Caracterizar físico-quimicamente as nanodispersões;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanodispersões contendo ibrutinibe;
- Determinar *in vitro* o perfil de liberação do ibrutinibe a partir dos CLN;
- Determinar *in vitro* a o perfil de permeação cutânea do ibrutinibe a partir dos CLN;
- Determinar a interação entre os CLN e o estrato córneo;
- Avaliar *in vitro* o perfil irritativo das nanoformulações;
- Incorporar os melhores CLN em hidrogel;
- Caracterizar físico-quimicamente as nanoformulações incorporadas no hidrogel;
- Avaliar a estabilidade físico-química das nanoformulações incorporadas no hidrogel;
- Determinar *in vitro* a permeação cutânea do ibrutinibe a partir do hidrogel;
- Avaliar o impacto da massagem na permeação cutânea *in vitro* do ibrutinibe a partir das nanoformulações desenvolvidas;
- Determinar o perfil reológico das nanoformulações;
- Avaliar *in vivo* o efeito antitumoral da nanoformulação em modelo murino de melanoma metastático.

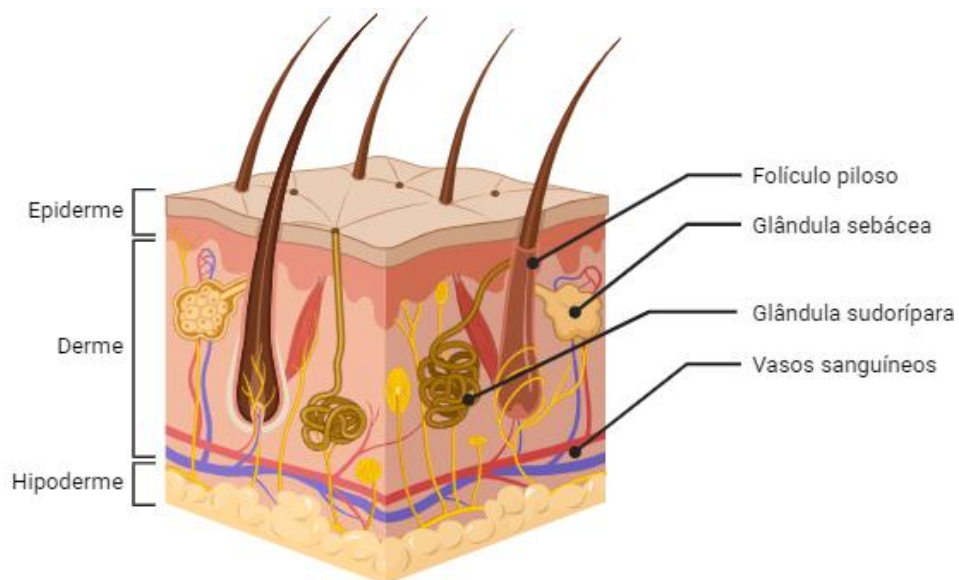
### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

---

### 3.1. A pele e vias de permeação cutânea

A pele, o maior órgão do corpo humano, representa aproximadamente 15% do peso corporal, cobrindo uma área de aproximadamente 2 m<sup>2</sup> em indivíduos adultos. Atuando como primeira linha de defesa contra micro-organismos, componentes químicos, traumas físicos e contra radiação UV, a pele desempenha um complexo e importante papel na manutenção da homeostase, no controle da temperatura corporal, regulação da perda de água e atividade sensorial<sup>35-37</sup>.

A pele é formada por três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme (tecido subcutâneo), cada uma apresentando tipos celulares e características distintas (Figura 1)<sup>35</sup>. A hipoderme, camada mais profunda, é predominantemente composta pelos adipócitos, que armazenam gordura como reserva de energia e fornecem proteção ao organismo contra impactos. Por sua vez, a derme, localizada entre a hipoderme e a epiderme, é composta por uma matriz fibrosa, incluindo as fibras de colágeno, elastina, fibronectina e por proteoglicanas, produzidas pelos fibroblastos, células predominantes nessa camada. Com espessura de 1 a 4 mm, desempenha um papel crucial na sustentação e nutrição da epiderme<sup>36,37</sup>. Além disso, a derme abriga os anexos cutâneos, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas<sup>35</sup>.



*Figura 1: Representação das camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e as estruturas que a compõe. Autoria própria.*

A epiderme (Figura 2), que constitui a camada mais externa da pele, é uma camada avascular, composta em sua maioria por queratinócitos, células responsáveis pela formação de queratina e pelo processo de descamação<sup>35</sup>. Ela é subdividida em cinco camadas principais:

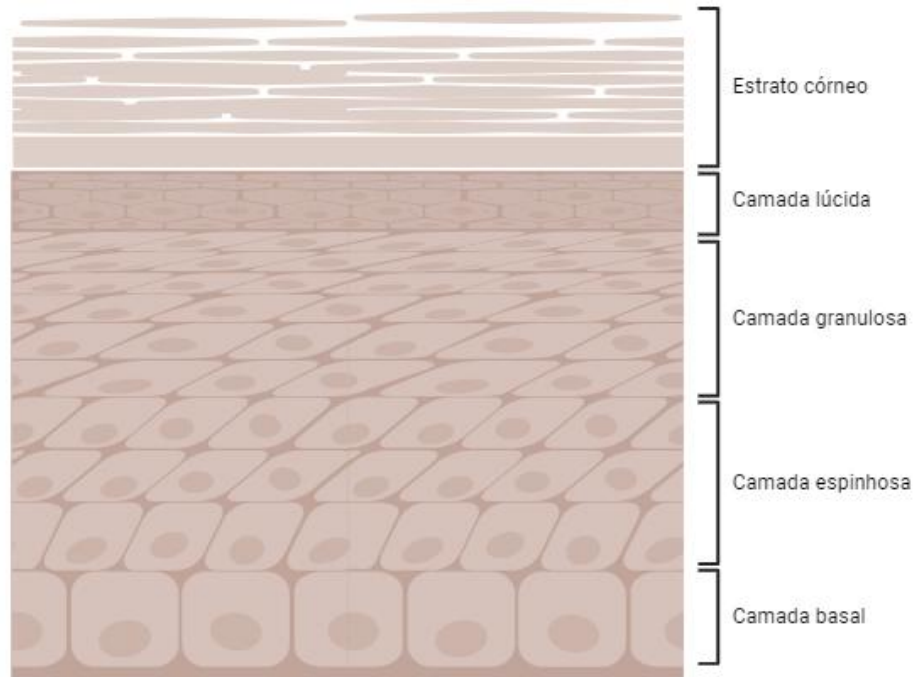
camada córnea (ou estrato córneo), camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal, sendo o estrato córneo a camada mais externa, e a camada basal, a mais interna. No entanto, a quantidade de camadas pode variar de acordo com a região anatômica<sup>38</sup>. Em cada estrato, os queratinócitos passam por um processo de queratinização e diferenciação celular<sup>35</sup>.

A camada basal, localizada na parte mais profunda da epiderme, consiste em uma ou duas fileiras de células-tronco, conhecidas como células basais. Essas células apresentam intensa atividade mitótica, replicando-se e diferenciando-se em queratinócitos, o que inicia o processo de migração das células para a superfície da pele<sup>38</sup>.

A próxima camada, a camada espinhosa, é onde os queratinócitos começam a formar conexões intercelulares, por meio de canais de proteínas chamados de desmossomos, conferindo às células uma aparência espinhosa quando analisadas por microscopia. Na camada granulosa, os queratinócitos apresentam diversos grânulos de queratina, enquanto começam a perder as suas organelas e sua morfologia se torna mais compactada<sup>38</sup>.

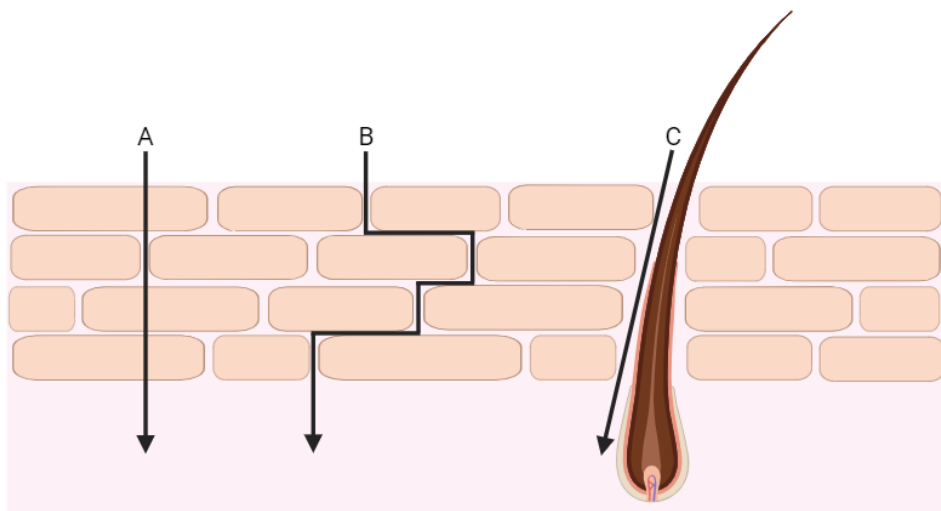
Finalmente, a última camada é o estrato córneo, que tem espessura de 10 a 20  $\mu\text{m}$  e representa a etapa final de diferenciação e queratinização dos queratinócitos. Essa camada é formada por células mortas e anucleadas, chamadas corneócitos, resultado do processo de apoptose dos queratinócitos. Essas células permanecem conectadas umas às outras pelos desmossomos e são revestidas por uma matriz lipídica composta principalmente por ceramidas, colesterol, ácidos graxos livres, triglicerídeos e ésteres<sup>35,38</sup>.

Os queratinócitos são as células predominantes na epiderme, embora outras células também residam nessa camada, como os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel. Os melanócitos, localizados na camada basal, sintetizam melanina e a transferem para os queratinócitos adjacentes em vesículas chamadas de melanossomos, contribuindo para a proteção do núcleo das células contra os danos da radiação UV. As células de Langerhans, por sua vez, são encontradas geralmente nas camadas espinhosa e granulosa, e desempenham papel crucial na apresentação de antígenos, possuindo dendritos semelhantes aos dos melanócitos. As células de Merkel estão associadas às terminações nervosas e provavelmente desempenhem funções sensoriais na pele<sup>36,38</sup>.



**Figura 2:** Representação da estrutura e camadas da epiderme: estrato córneo, camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal. Autoria própria.

Essa estrutura complexa garante à pele a sua função de barreira, impedindo a entrada de agentes externos no organismo<sup>36</sup>. A função de barreira do estrato córneo é atribuída principalmente às proteínas hidrofílicas de queratina, compactadas em lamelas lipofílicas. No entanto, apesar dessa organização eficiente, existem mecanismos que permitem a passagem de moléculas através do estrato córneo. As principais vias de permeação são as vias transcelular, intercelular e transfolicular(Figura 3)<sup>39</sup>.



**Figura 3:** Esquema representativo das vias de permeação cutânea: A) via transcelular; B) via intercelular; C) via transfolicular. Autoria própria.

A via transcelular é caracterizada pela capacidade de uma molécula atravessar completamente o estrato córneo, incluindo a passagem pelos queratinócitos e pela matriz lipídica intercelular, o que é facilitado principalmente pelas moléculas com características mais hidrofílicas. Por outro lado, na via intercelular, as moléculas passam entre as células do estrato córneo, percorrendo um caminho extenso e sinuoso pela matriz extracelular. Essa via favorece a permeação de fármacos mais lipossolúveis. Quanto à via transfolicular, ela é desempenhada quando os fármacos se difundem através dos anexos cutâneos, como folículos pilosos, glândulas sebáceas ou glândulas sudoríparas. Embora não seja a principal rota de permeação para formulações convencionais, estudos recentes indicam que o uso da nanotecnologia ou de métodos físicos como a iontoforese pode favorecer a passagem de fármaco por essa via de permeação<sup>35,40</sup>.

### **3.2.Melanoma: epidemiologia e classificação**

O câncer de pele corresponde a um grande grupo de malignidades cutâneas que pode se originar a partir de diferentes células da pele, como queratinócitos e melanócitos, presentes na epiderme ou nos anexos cutâneos<sup>1</sup>. De maneira geral, eles são classificados em dois grupos: câncer de pele melanoma e o câncer de pele não-melanoma. Essa classificação deve-se à grande variedade de apresentações clínicas e diferença de prognóstico que essa doença apresenta<sup>1</sup>. Dentre os tumores, os cânceres de pele estão entre os tipos de câncer com maior frequência de malignidade no corpo. Isso se deve, em partes, pela alta taxa de mutação que esses tumores apresentam<sup>41</sup>, pela sua alta capacidade imunossupressora, angiogênica e pela capacidade infiltrativa que esses tumores adquirem no decurso do seu desenvolvimento<sup>42,43</sup>.

O melanoma é um tumor maligno que se origina dos melanócitos<sup>2</sup>, células da camada basal da epiderme que têm como principal função prover melanina aos queratinócitos<sup>3,4</sup>. Além de colonizar a pele e os folículos pilosos, os melanócitos também podem ser encontrados em demais tecidos, como em superfícies da mucosa da cavidade oral, nasal, trato anogenital, na íris do trato uveal, nas meninges, entre outros<sup>44</sup>. Mesmo representando cerca de 1 a 5% dos cânceres de pele, o melanoma é responsável por mais de 80% dos óbitos por doenças cutâneas<sup>5,45</sup>.

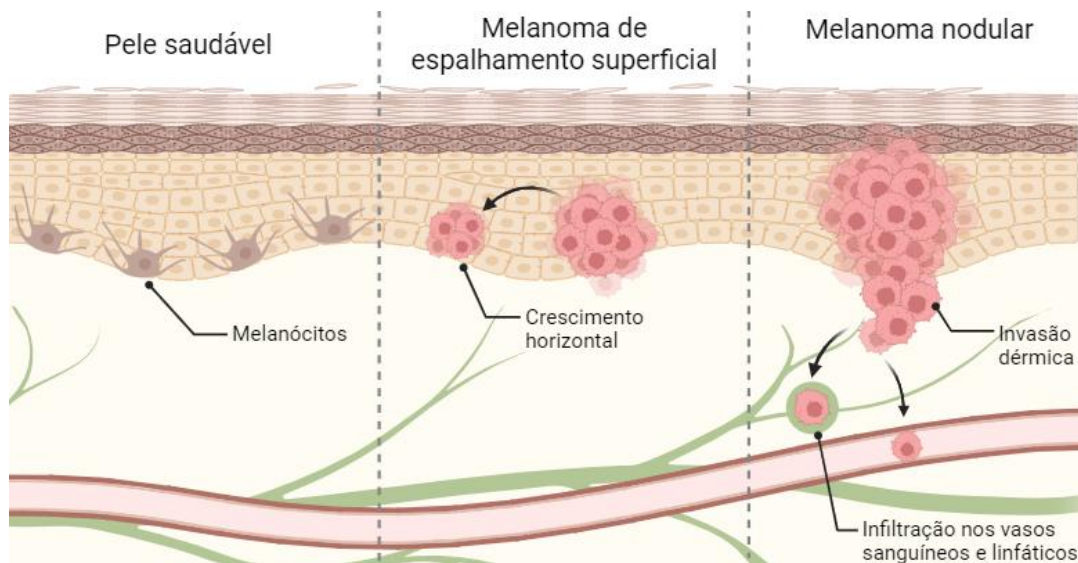
O melanoma é uma das doenças malignas que mais tem aumentado a sua incidência anualmente nas últimas cinco décadas<sup>2,5</sup>. Nos últimos anos, a incidência do melanoma tem crescido em torno de 3% por ano na população norte-americana<sup>8,46</sup>. Esse aumento pode ser observado comparando a população dos Estados Unidos entre 1975 e 2018, em que o aumento dos casos de foi de 320%. Em 1975, para cada 100 mil habitantes norte-americanos, 7,9 desenvolviam melanoma. Já em 2018, a incidência foi de 25,3 para cada 100 mil habitantes<sup>6,47</sup>.

Apenas em 2020, 235 mil novos casos de melanoma foram registrados nos Estados Unidos, representando 1,7% dos cânceres diagnosticados neste ano, se tornando o sexto câncer mais comum entre mulheres e o quinto mais comum entre homens<sup>47,48</sup>. Na Austrália, país com maior incidência global<sup>47</sup>, o número de novos casos de melanoma subiu de 26,4 para 51,6 para cada 100 mil habitantes entre 1982 e 2011<sup>6,48</sup>.

A grande variação de incidência entre diferentes países dá-se por padrões de risco associados à determinada população, como fototipo predominante na população e hábitos diferentes de exposição ao sol<sup>49</sup>. Populações que apresentam o predomínio de indivíduos caucasianos podem ter o aumento da incidência de melanoma cutâneo em 10 vezes quando comparado com populações predominantemente de fototipo IV ao VI<sup>9</sup>. Entretanto, o desenvolvimento de melanomas não-cutâneos, como os melanomas de mucosa, é mais comum em indivíduos não-caucasianos<sup>47</sup>.

Sobre a letalidade, em 2020, aproximadamente 57 mil mortes por melanoma foram registradas no mundo. Já em 2021, foram registradas 7180 mortes por melanoma nos Estados Unidos, em indivíduos com idade média de 71 anos<sup>9,48</sup>. A sua letalidade está fortemente relacionada com o estágio em que o melanoma é diagnosticado. Quando diagnosticado nos estágios iniciais da doença (estágio I), o melanoma pode ser tratado com ressecção cirúrgica, promovendo um tempo de sobrevida livre da doença acima de cinco anos em 98% dos pacientes. Entretanto, essa porcentagem cai substancialmente em pacientes que estavam em estágios avançados da doença no momento do diagnóstico, com queda da sobrevida livre de cinco anos para cerca de 70% para os que apresentam acometimento dos linfonodos no momento do diagnóstico, e cerca de 5% para os pacientes com metástases para tecidos distantes<sup>9,47</sup>.

O melanoma apresenta quatro classificações clínicas distintas: melanoma com espalhamento superficial, melanoma nodular, lentiginoso maligno e o melanoma acral. Cada classificação apresenta diferentes decursos clínicos e diferentes vias de formação do melanoma, mas todas apresentam em comum a alta capacidade de invasão profunda e metástase para tecidos distantes<sup>8</sup>. O melanoma de espalhamento superficial, subtipo mais comum, representando cerca de 60 a 70% dos casos, é caracterizado por um período inicial de crescimento horizontal, com pouca invasão tecidual, seguido por um período de crescimento vertical e invasão da derme<sup>8,47</sup>. Por outro lado, o melanoma nodular é caracterizado pelo crescimento vertical sem um período radial prévio, apresentando alta invasão dérmica e elevado risco de metástase, sendo responsável por mais de 40% das mortes relacionadas ao melanoma, apesar da sua baixa incidência(Figura 4)<sup>8,47</sup>.



**Figura 4:** Representação das classificações clínicas dos melanócitos. Na pele saudável, é possível observar a distribuição dos melanócitos pela camada basal da epiderme. O melanoma de espalhamento superficial é considerado o primeiro estágio do melanoma, com pouca invasão tecidual. Já o melanoma nodular é considerado de grande potencial metastático, com invasão dérmica e infiltração vascular e linfática de células malignas. Autoria própria.

O estágio de desenvolvimento do melanoma é classificado em estágios de I a IV, variando de lesões pequenas sem invasão no tecido adjacente, até metástase para os tecidos mais distantes<sup>43</sup>. Quanto ao sítio anatômico, o melanoma pode ser classificado em cutâneo, acral, uveal e melanoma de mucosa, sendo o cutâneo o de maior prevalência entre eles, representando cerca de 90% dos casos de melanoma<sup>48</sup>. Os melanomas não-cutâneos, embora sejam menos comuns, tendem a ser diagnosticados mais tardiamente, por causa da sua dificuldade de visualização, resultando em um prognóstico menos favorável<sup>47</sup>. É importante ressaltar que os cânceres de pele podem afetar regiões como cabeça e pescoço. Como a intervenção cirúrgica é uma das principais condutas terapêuticas disponíveis atualmente, o melanoma, mesmo quando tratado nos estágios iniciais, pode afetar negativamente também a qualidade de vida da pessoa acometida, com marcas irreversíveis, mesmo após intervenções cirúrgicas plásticas<sup>13</sup>.

A origem e o desenvolvimento do câncer de pele são multifatoriais, ocorrendo tanto por fatores ambientais, como a exposição à luz UV, quanto pela susceptibilidade genética, como histórico familiar e presença de nevos melanocíticos espalhados pelo corpo<sup>15</sup>. Assim como em outros tipos de câncer, várias alterações genéticas são observadas no decurso da doença. Essas alterações podem se acumular em etapas discretas, progredindo de um tumor benigno, com replicação limitada, até um tumor maligno, sem controle de replicação e com alta capacidade infiltrativa<sup>50</sup>.

Esse acúmulo de mutações ocorre, em partes, pela incidência de luz UV ao qual esses tumores são expostos, favorecendo o dano no DNA e desenvolvimento de novas mutações<sup>41,43</sup>. Nos melanomas também são observadas diversas mutações somáticas ocorrendo no decurso da doença, principalmente em genes envolvidos em processos de proliferação e crescimento celular<sup>3,16</sup>. Esses genes são conhecidos como “drivers” do melanoma, sendo as mutações em BRAF e a NRAS as com maior aparecimento no melanoma<sup>50</sup>. É estimado que 50 a 65% dos melanomas cutâneos apresentam a mutação em BRAF, enquanto outros 20% apresentam a mutação em NRAS, estas normalmente excludentes entre si<sup>49</sup>.

Entretanto, essas mutações isoladamente não são capazes de formar um melanoma. Isso é observado em nevos melanocíticos, que são proliferações clonais de melanócitos que adquiriram mutações favoráveis para a sua replicação, mas sem mutações suficientes para superar os mecanismos de supressão tumoral, resultando em estabilidade das células<sup>49,50</sup>. É estimado que mais de 80% dos nevos melanocíticos benignos apresentam mutação em BRAF, resultando em uma proliferação melanocítica<sup>49,50</sup>. Porém, esse nevo pode permanecer quiescente por anos, devido a vigilância imunológica<sup>43</sup>, sem alteração na sua coloração ou tamanho<sup>49</sup>.

De maneira geral, a maioria das alterações nesses genes “drivers” interferem em duas vias de sinalização principais: MAPK e PI3K/AKT. A via de sinalização MAPK está fisiologicamente envolvida com a transdução de sinais extracelulares, como fatores de crescimentos e hormônios, resultando na expressão de genes relacionados com a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular<sup>41,49</sup>.

### **3.3. Tratamentos e desafios terapêuticos para melanoma**

O tratamento do melanoma evoluiu nos últimos 10 anos com a aprovação de novos medicamentos pelo FDA. Cerca de 13 novos medicamentos foram aprovados, incluindo os fármacos de terapia alvo-dirigida, terapias imunológicas e fármacos utilizados na terapia fotodinâmica. Além disso, o uso de medicamentos tópicos também tem sido promissor na terapia<sup>8,9</sup>.

De fato, a ressecção cirúrgica com borda de segurança de pelo menos 4 mm ainda é o principal meio de tratamento clínico dos tumores de pele<sup>13,51</sup>. Entretanto, para o melanoma, a ressecção cirúrgica costuma ser curativa apenas para os pacientes diagnosticados nos estágios iniciais da doença. Naqueles diagnosticados tardiamente ou com histórico de relapsos, pode haver o acometimento de linfonodos sentinelas ou regiões distantes ao tumor, sendo necessária a terapia sistêmica. Porém, dentre os tumores diagnosticados em estágio IV, aproximadamente

um terço apresenta metástase visceral ou cerebral. Nesses casos, a probabilidade de resposta ao tratamento medicamentoso é baixa, representando uma limitação dos tratamentos disponíveis atualmente<sup>49</sup>.

Até 2011, o principal tratamento de escolha para os pacientes com melanoma metastásico era o uso de quimioterapia. Nesses pacientes, é necessário a utilização de terapia medicamentosa, pois apenas a ressecção cirúrgica não é curativa<sup>43,52</sup>. Depois de 2011, houve a aprovação do uso de inibidores da BRAF e inibidores da MEK, aprovados pelo FDA para o tratamento sistêmico do câncer de pele melanoma<sup>8,49</sup>, sendo o vemurafenib e o dabrafenib os primeiros fármacos aprovados para essa finalidade<sup>43</sup>. Depois desses, outros medicamentos foram desenvolvidos e aprovados, como o cobimetinib, um inibidor da MEK<sup>7</sup>.

Inicialmente, o uso de inibidores da BRAF mostrou ser um tratamento promissor, com boa taxa de resposta inicial. Entretanto, com o tempo, foi observado que essa conduta terapêutica causava rápida resistência medicamentosa. Com isso, hoje é preconizado o uso de inibidores da BRAF apenas nos pacientes positivos para a mutação BRAF<sup>V600E</sup> e em combinação com outros medicamentos, como os inibidores da MEK ou com as terapias imunológicas<sup>7,9</sup>. Essas combinações têm apresentado uma boa taxa de resposta, com aumento da sobrevida livre de progressão tumoral e controle dos sintomas<sup>7,49</sup>. Entretanto, mesmo com esse progresso, essas condutas terapêuticas não resultaram em cura para a maioria dos pacientes com melanoma metastásico, com sobrevida de aproximadamente 10% em 5 anos de tratamento<sup>9</sup>.

Outra classe de medicamentos sistêmicos aprovados pelo FDA que vêm sendo utilizados no tratamento de melanoma são os inibidores de *checkpoint* imunológico. Os primeiros aprovados foram os anti-CTLA4 e anti-PD1. Os anti-CTLA4 mais utilizados incluem o nivolumab, pembrolizumab e o ipilimumab. Já os anti-PD1, destacam-se o vemurafenib e dabrafenib<sup>53,54</sup>. Entretanto, esses medicamentos apresentam baixa taxa de resposta quando administrados isoladamente e são associados a reações adversas graves, levando a descontinuação do tratamento em mais de 50% dos pacientes<sup>53,54</sup>. Para melhorar a sua resposta, foi explorada também a administração desses medicamentos em combinação com inibidores da BRAF. Embora isso resulte em uma resposta mais duradoura ao tratamento, há um aumento na frequência de reações adversas, se tornando o principal fator limitante ao tratamento<sup>49</sup>.

Recentemente, a terapia tópica também tem avançado no tratamento dos cânceres de pele, principalmente nos superficiais. Nesses casos, por mais que a intervenção cirúrgica seja curativa para a maioria dos pacientes, o tratamento tópico pode ser levado em consideração em certos contextos clínicos, como nos casos em que o tumor está nos estágios iniciais, ou quando este se desenvolve em áreas expostas, como na face, e a ressecção deixará marcas<sup>55,56</sup>.

Entretanto, a escolha pelo tratamento tópico deve levar em consideração o tamanho e a localização do tumor, pois os tratamentos tópicos atualmente disponíveis ainda possuem taxa de cura abaixo da intervenção cirúrgica<sup>56,57</sup>, em partes limitada pela baixa capacidade de permeação de alguns fármacos<sup>55</sup>.

Dentre os medicamentos utilizados na terapia tópica, destacam-se o 5-fluorouracil, imiquimod e o ingenol mebutate<sup>56</sup>. Entretanto, esses tratamentos são aprovados pelo FDA apenas para o tratamento de cânceres de pele não-melanoma<sup>58</sup>, sendo o imiquimod o único usado atualmente na prática clínica para o tratamento de melanoma lentiginoso, no uso *off-label*, como terapia adjuvante<sup>55,56</sup>. Além das suas limitações clínicas, os medicamentos tópicos disponíveis atualmente apresentam alta taxa de reações adversas, com aparecimento de dor, eritema, formação de crostas e prurido<sup>55</sup>, podendo aparecer em mais de 90% dos pacientes.<sup>59,60</sup>

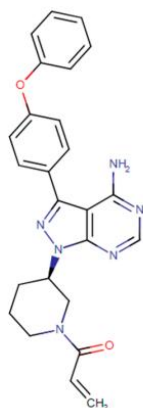
De maneira geral, por mais que o uso da terapia tópica para o tratamento de cânceres de pele do tipo não-melanoma representem um avanço na terapia, as opções para o tratamento de melanoma permanecem limitadas. A facilidade de acesso aos tumores de pele é um fator facilitador do uso de medicamentos tópicos, e a possibilidade que o próprio paciente faça a aplicação do medicamento reduz o número de visitas ao ambiente hospitalar. Isso confere grande vantagem para a utilização dos medicamentos tópicos, tanto no tratamento principal, quanto na terapia adjuvante. No entanto, devido à baixa permeação e do grande número de reações adversas, as formulações convencionais são limitadas aos pacientes com tumores pequenos e superficiais. Portanto, é evidente a necessidade de mais estudos, tanto com formulações convencionais quanto com formulações nanoestruturadas. Apesar dessas limitações, os resultados da terapia tópica têm se mostrado animadoras, principalmente quando a única alternativa para alguns casos é a ressecção cirúrgica.

### **3.4. Ibrutinibe**

Apesar dos marcos significativos no avanço do tratamento do melanoma, como o uso da terapia combinada, a resistência aos medicamentos e alta taxa de reações adversas ainda ocorre em uma proporção significativa dos pacientes em tratamento<sup>8,9</sup>. Além disso, essas opções não oferecem cura para a maioria dos pacientes, fazendo com que a ressecção local continue sendo a opção primária de tratamento clínico, viável apenas para os pacientes diagnosticados nos estágios iniciais da doença<sup>10,11</sup>. Entretanto, ao observarmos os avanços terapêuticos mais recentes obtidos em outros tipos de cânceres, como cânceres sólidos e onco-hematológicos,

vemos que toda essa situação enfrentada pelo melanoma se contrasta, principalmente com os avanços obtidos com o uso do inibidor de tirosina quinase ibrutinibe<sup>14</sup>.

O ibrutinibe (Figura 5) é um dos poucos inibidores de tirosina quinase que têm sido investigados para o tratamento de cânceres sólidos e não-sólidos. As proteínas tirosina quinases são frequentemente alvo de mutações ou desregulações no câncer, tornando-as foco importante em estudos para o desenvolvimento de tratamentos para diversos tipos de câncer, desde o sucesso do Imatinibe no tratamento da Leucemia Mieloide Crônica em 2001<sup>61</sup>. Posteriormente, as quinases de tirosina se tornaram os alvos terapêuticos mais extensivamente explorados nos últimos anos, com numerosos inibidores desenvolvidos e aprovados pela FDA para tratar vários tipos de câncer<sup>14,62</sup>.



**Figura 5:** Estrutura química do ibrutinibe. Peso molecular: 440,507 g/mol; pKa: 3,74; logP: 3,97; fórmula molecular  $C_{25}H_{24}N_6O_2$ .

Caracterizado como um pó branco inodoro, com peso molecular de 440,507 g/mol e fórmula molecular  $C_{25}H_{24}N_6O_2$ , o ibrutinibe é um inibidor que visa principalmente a tirosina quinase de Bruton, especificamente no aminoácido Cys 481 no domínio de ligação ao ATP. A BTK desempenha um papel crítico na via de sinalização do receptor de células B (BCR), influenciando a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular<sup>15,16</sup>. No entanto, é importante observar que o ibrutinibe também pode se ligar a outras proteínas quinases que possuem o mesmo resíduo de cisteína, permitindo que o ibrutinibe atue em diversos alvos moleculares. Esses alvos incluem os receptores dos fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGRF), crescimento epidérmico (EGFR) e crescimento de fibroblastos (FGFR), bem como quinase de linfócitos B (BLK) e quinase Janus 3 (JAK3).<sup>17,18</sup>

Essa ampla gama de alvos do ibrutinibe motivou investigações sobre seu mecanismo de ação em diversos processos biológicos. Em modelos de câncer esofágico, pulmonar e hepático, foi observado o efeito antitumoral da inibição da via do EGFR<sup>7,19,63</sup>. Em um modelo de câncer de mama, o ibrutinibe mostrou-se capaz de induzir a morte celular, além de reduzir a massa tumoral e a metástase pulmonar<sup>18,24</sup>. A inibição da BTK pelo ibrutinibe em um modelo experimental de câncer gástrico também foi associada à redução do tumor, alcançada por meio do controle da proliferação celular e da indução da morte celular<sup>51</sup>.

No entanto, apesar da eficácia do ibrutinibe no tratamento do câncer, sua toxicidade pode levar à redução da dose ou à interrupção do uso<sup>20</sup>. Os principais efeitos adversos associados ao uso sistêmico do ibrutinibe incluem fibrilação atrial, hemorragias, hipertensão, mialgia, anemia, infecções e diarreia, com algumas reações persistindo mesmo após a interrupção do tratamento<sup>21</sup>. No nível cutâneo, aproximadamente 30% dos pacientes que recebem medicação oral desenvolvem erupção cutânea e infecção de pele, bem como dermatose neutrofílica, edema periférico e fissuras<sup>64,65</sup>.

Além das reações adversas, a administração do ibrutinibe enfrenta desafios relacionados à sua baixa solubilidade ( $\log P = 3,97$ ; solubilidade em água de aproximadamente 0,002 mg/mL) e ao extenso efeito de primeira passagem. Isso leva a uma biodisponibilidade muito baixa, aproximadamente 2,9%, que pode ser ainda menor, dependendo do estado nutricional do paciente<sup>22,23,66</sup>. Consequentemente, os medicamentos orais estão disponíveis em formulações contendo altas doses do medicamento, variando de 420 a 840 mg por dia, dependendo do tipo de câncer em tratamento, o que aumenta a ocorrência dos efeitos adversos mencionados, particularmente as reações gastrointestinais<sup>25,67</sup>.

Uma alternativa para reduzir ou eliminar as reações adversas associadas à administração oral é o uso da administração tópica. Essa abordagem tem se mostrado eficaz na liberação de certos agentes quimioterápicos diretamente em tumores cutâneos, considerando sua fácil acessibilidade<sup>26</sup>. Além disso, a administração tópica oferece a vantagem de minimizar as interações medicamentosas e a dosagem necessária, tornando os produtos mais economicamente acessíveis. Ademais, é uma via de administração de fácil aplicação e permite a interrupção em caso de reações indesejadas. Entretanto, o primeiro desafio encontrado durante o desenvolvimento de formulações dermatológicas é desenvolver e validar uma metodologia analítica confiável que permita identificar e quantificar o fármaco nos modelos experimentais de pele<sup>26</sup>, uma matriz biológica complexa com muitas substâncias que podem interferir a análise<sup>27,68</sup>.

Na literatura, alguns métodos são descritos para a detecção e quantificação de ibrutinibe. Entretanto, esses métodos foram desenvolvidos especificamente para a quantificação de ibrutinibe na presença de outros contaminantes, como plasma humano ou de coelho<sup>66,69,70</sup>. Dentre os métodos descritos, foi documentado um método que detecta o ibrutinibe em meio aos contaminantes da pele. Contudo, esse método analítico utilizou o modelo de pele de camundongo, além do método não ter sido validado em termos de seletividade, precisão e exatidão<sup>71</sup>. Sendo assim, é vantajoso desenvolver um modelo analítico que permita a detecção e quantificação do ibrutinibe em modelos de pele suína, pois esse modelo é considerado padrão ouro para estudos cinéticos de permeação cutânea<sup>72</sup>.

Além da dificuldade em quantificar o ibrutinibe nos modelos de pele, outra dificuldade relacionada com o desenvolvimento de uma formulação dermatológica é garantir que a absorção percutânea do fármaco atinja níveis terapêuticos nos locais onde os tumores invasivos estão localizados<sup>28</sup>. O estrato córneo, os queratinócitos presentes nas demais camadas da epiderme e a matriz extracelular, são responsáveis por impedir que substâncias externas ao corpo penetrem a pele<sup>73</sup>. Devido à lipofilicidade do ibrutinibe<sup>29</sup>, sua penetração passiva através do estrato córneo e a obtenção de concentrações terapêuticas em melanomas localizados nas camadas mais profundas da epiderme pode ser desafiadora<sup>30</sup>.

### **3.5. Nanotecnologia**

Apesar das vantagens da aplicação tópica de medicamentos, como a redução das reações adversas sistêmicas, maior concentração do fármaco no sítio de ação e redução do metabolismo de primeira passagem, atravessar a barreira cutânea ainda é o maior desafio para esse tipo de administração. Para isso, duas estratégias principais são utilizadas pela indústria farmacêutica: o uso de promotores de permeação ou o uso de formulações nanotecnológicas. Dentre essas, a estratégia que vem apresentando a maior vantagem para a aplicação dermatológicas de medicamento com baixa biodisponibilidade tópica é a nanotecnologia<sup>74</sup>.

A nanotecnologia é uma área da ciência multidisciplinar que nasceu nos anos 20 e que, nos últimos anos, vem sendo cada vez mais estudada pela indústria farmacêutica. Esse interesse ocorre principalmente no desenvolvimento de produtos de diagnósticos e sistemas inovadores de liberação de fármacos. Esses sistemas têm criado possibilidades para o uso de fármacos que anteriormente enfrentavam desafios para ser incorporados a formulações convencionais. Esses desafios podem ser atribuídos à capacidade limitada de incorporação dos fármacos nas

formulações convencionais, ou à instabilidade físico-química que os fármacos contidos nelas apresentavam<sup>75</sup>.

A nanotecnologia tem assumido um papel cada vez mais significativo na pesquisa científica, especialmente no desenvolvimento de medicamentos de alto desempenho. Medicamentos nanoestruturados são projetados principalmente para transportar uma ampla variedade de fármacos e biofármacos, aprimorando sua funcionalidade, reduzindo as doses sem comprometer a eficácia, aumentando a segurança terapêutica e facilitando a liberação direcionada ao local de ação por meio de várias vias de administração<sup>33,76</sup>. Eles apresentam a qualidade de melhorar a capacidade de carga dos fármacos, melhorar a estabilidade e promover uma ação prolongada e sustentada<sup>77</sup>.

A versatilidade na seleção de materiais na produção das nanopartículas, que engloba o uso de nanoemulsões, lipossomos, nanopartículas lipídicas, poliméricas, metálicas, entre outros, oferece um conjunto de opções na aplicação a nanotecnologia para o desenvolvimento de novas formulações. Essa diversidade permite a seleção adequada de um nanossistema específico, levando em consideração as características físico-químicas do fármaco em questão e aos objetivos desejados para o desenvolvimento da formulação<sup>78</sup>.

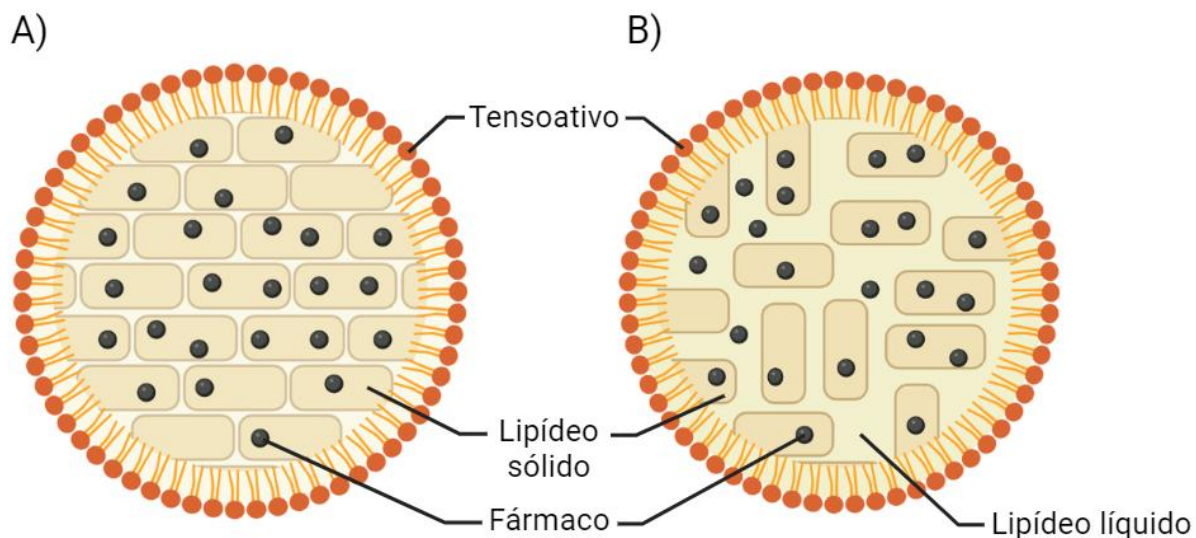
Quanto ao uso de medicamentos dermatológicos, as formulações nanoestruturadas apresentam vantagem em relação aos sistemas semissólidos convencionais, por prolongar a ação terapêutica dos fármacos incorporados<sup>77</sup>. Em geral, as nanopartículas atuam como reservatórios de fármacos, mantendo altas concentrações dos fármacos em contato com a pele por períodos prolongados, o que além de aumentar a concentração do fármaco no sítio de ação, também promove a liberação controlada, reduzindo assim a frequência necessária de administrações do medicamento<sup>74</sup>.

Entre os diversos tipos de carreadores nanoestruturados utilizados em formulações farmacêuticas, os sistemas baseados em lipídeos têm surgido como opções notáveis devido à sua alta biocompatibilidade e adequação para aplicação tópica<sup>30,32</sup>. Além disso, os sistemas baseados em lipídeos são considerados estáveis, facilmente obtidos e escalonáveis, permitindo a produção semi-industrial e industrial<sup>30</sup>. Ademais, estudos mostram que a interação dos lipídeos presentes nas partículas lipídicas com os lipídeos presentes na pele pode promover um rearranjo no estrato córneo, atuando como promotor de permeação. Adicionalmente, esses sistemas têm a vantagem de formar um fino filme lipídico sobre a pele, impedindo a evaporação de água e promovendo a hidratação por oclusão<sup>34,75,79</sup>.

Os sistemas baseados em lipídeos sólidos foram desenvolvidos nos anos 1990 como uma alternativa aos sistemas de liberação de fármacos como lipossomos e nanoemulsões. Devido à biocompatibilidade, versatilidade e menor curso dos lipídeos utilizados para o desenvolvimento das formulações, as nanopartículas lipídicas oferecem vantagens em relação aos sistemas poliméricos e inorgânicos<sup>74</sup>.

As nanopartículas lipídicas sólidas (Figura 6A) representam a primeira geração de nanopartículas lipídicas, constituídas por partículas formadas por um núcleo lipídico sólido à temperatura ambiente, dispersa em um meio aquoso com o auxílio de tensoativos e outros estabilizantes. Esse avanço surgiu como uma melhoria das nanoemulsões, substituindo os lipídeos líquidos por sólidos. Com ponto de fusão acima de 40°C, esses lipídeos asseguram que as partículas permaneçam sólidas durante o armazenamento e após a administração, conferindo maior resistência ao sistema e possibilitando um controle eficaz da liberação do fármaco<sup>74,75</sup>. Os lipídeos utilizados podem incluir ácidos graxos, ceras, triglicerídeos, entre outros, e essas nanopartículas têm ampla aplicação na indústria farmacêutica para melhoria da estabilidade físico-química dos fármacos, mantendo-os protegidos dentro do núcleo lipídico e sendo compatível com uma ampla variedade de fármacos<sup>77</sup>.

No entanto, apesar das vantagens desse sistema, o polimorfismo dos lipídeos sólidos e a sua recristalização durante o processo de armazenamento promovem a expulsão do fármaco de dentro do núcleo lipídico das partículas<sup>75</sup>. Com isso, pesquisadores desenvolveram uma segunda geração de nanopartículas lipídicas: os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Os CLN (Figura B) constituem em partículas formadas por uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos dispersos em uma fase aquosa contendo tensoativos. Essa configuração resulta em uma suspensão coloidal de partículas sólidas à temperatura ambiente, com dimensões variando de 10 a 1000 nm, possibilitando um melhor controle da liberação do fármaco, permeação aprimorada e estabilidade física da formulação<sup>32-34</sup>. Além disso, os lipídeos presentes nesses nanossistemas podem interagir com a combinação de ceramidas e ácidos graxos presentes no estrato córneo, gerando um efeito oclusivo e aumentando a fluidez dos lipídeos, o que, por sua vez, influencia a permeação do fármaco através do estrato córneo<sup>34,80</sup>.



**Figura 6:** Comparação da estrutura básica de (A) nanopartículas lipídicas sólidas e (B) carreadores lipídicos nanoestruturados. Autoria própria.

A presença de lipídeos líquidos na composição das partículas promove um melhor acomodamento dos lipídeos sólidos, que formam estruturas imperfeitas da mistura dos lipídeos, promovendo maior capacidade de carga de fármaco e menor expulsão do fármaco durante a estocagem do medicamento<sup>77</sup>. Adicionalmente, a presença do lipídeo líquido melhora o processo de recristalização dos lipídeos sólidos durante a estocagem<sup>74</sup>.

Ao utilizar misturas de lipídeos sólidos e líquidos, surge uma grande variedade de combinações de lipídeos, proporcionando um amplo conjunto de opções em termos de composição. A proporção entre lipídeos sólidos para lipídeos líquidos pode variar consideravelmente, desde 70:30 até 99,9:0,1 (p/p). Além disso, o teor total de lipídeos nas formulações também pode variar de 5 a 40%, enquanto os tensoativos geralmente variam de 0,5 a 5%. Frequentemente, são utilizadas misturas de tensoativos para reduzir a toxicidade potencial de alguns e, assim, aumentar ainda mais a biocompatibilidade da formulação. A gama de lipídeos disponíveis para a seleção é ampla, incluindo ácidos graxos, ceras, ésteres ou triglicerídeos, além da possibilidade de utilizar óleos complexos com propriedades terapêuticas<sup>74</sup>.

As vantagens no uso de CLN no tratamento de câncer de pele têm sido evidenciadas nos estudos mais recentes. Formulações convencionais contendo 5-fluororacil demonstram baixa capacidade de permeação cutânea. Em contrapartida, estudos de permeação cumulativa do fármaco em pele de rato mostraram que o uso de formulações preparadas com CLN aumentaram a permeação do fármaco em duas vezes, quando comparadas com formulações convencionais<sup>81</sup>.

Da mesma forma, estudos comparando formulações contendo géis convencionais e CLN incorporado em géis contendo o mesmo fármaco demonstraram que a permeação do 5-fluororacil foi aumentada em 7,4 vezes pela formulação contendo CLN, quando comparada com a formulação convencional em pele de rato<sup>82</sup>. Já estudos envolvendo a preparação de CLN para incorporação de imiquimod também demonstraram que o uso de CLN aumentou a permeação cutânea em 3,3 vezes quando comparado com formulações convencionais, em modelo de pele de porco<sup>83</sup>.

Esses achados, em conjunto, sugerem que o desenvolvimento de formulações contendo CLN representa uma estratégia promissora para a criação de formulações inovadoras que incluem novos fármacos para o tratamento de câncer. Com base nessas informações, o presente estudo propôs-se a: (1) desenvolver um método analítico simples e rápido, capaz de detectar e quantificar de forma exata e precisa, o ibrutinibe presente em diferentes camadas de peles suínas; (2) desenvolver formulações dermatológicas baseadas em CLN para a administração tópica de ibrutinibe no tratamento de melanomas. Duas formulações de CLN foram preparadas, variando apenas a escolha do lipídeo líquido, para avaliar sua influência no perfil de liberação e permeação do fármaco.

## **4. DELINEAMENTO DO ESTUDO**

---

O primeiro lipídeo líquido selecionado foi o óleo de semente de romã, um óleo complexo amplamente utilizado na produção de nanoformulações<sup>84</sup>. O óleo de semente de romã é conhecido por suas propriedades antioxidantes e alto teor de ácidos graxos poli-insaturados<sup>85,86</sup>. Sua seleção foi baseada em relatos anteriores de sua eficácia no tratamento de tumores na literatura<sup>86,87</sup>, sua tolerância em culturas de queratinócitos e fibroblastos<sup>88</sup> e seu uso anterior na preparação de nanopartículas lipídicas<sup>89,90</sup>. O segundo lipídeo líquido foi o ácido oleico, escolhido com base em sua compatibilidade química e solubilidade com o ibrutinibe, com o objetivo de utilizar um óleo com características distintas do óleo de semente de romã.

Após a seleção dos óleos, duas nanoformulações foram preparadas e submetidas a uma caracterização abrangente. O processo de caracterização envolveu a análise do diâmetro hidrodinâmico, distribuição de tamanho, potencial zeta, pH, eficiência de encapsulação, carga do fármaco e teste da compatibilidade química entre o ibrutinibe e os componentes da formulação. Ambas as nanoformulações foram, então, submetidas à avaliação *in vitro* para determinar o perfil de liberação do ibrutinibe e avaliar a biodisponibilidade tópica usando modelos de pele *in vitro* e *ex vivo*. Além disso, foi investigada a interação entre os lipídeos da pele e os lipídeos da formulação, além da sua segurança tópica.

Após a realização desses experimentos, a formulação contendo CLN2 foi selecionada para dar prosseguimento aos experimentos. Para isso, visando melhorar as características sensoriais e facilitar a aplicação tópica, com o foco em iniciar uma etapa *in vivo* de experimentos, a formulação contendo CLN2 foi incorporada em um sistema de gel fluido a base de carboximetilcelulose (CMC). Esses sistemas são interessantes para a incorporação de carreadores lipídicos nanoestruturados devido às suas vantagens como facilidade na aplicação, ausência de oleosidade e facilidade de remoção com lavagem, caso seja necessário. Além disso, a incorporação em hidrogel envolve técnicas simples, facilmente escalonáveis para produções industriais. Um agente gelificante comumente usado para a incorporação de carreadores lipídicos é o Carbopol. Entretanto, devido a necessidade de neutralização deste polímero por um agente alcalino, pode alterar as características das partículas, como diâmetro hidrodinâmico das partículas e potencial zeta<sup>91</sup>. Por isso, uma alternativa para a incorporação em sistemas de gel fluido é o uso de derivados da celulose, como a CMC, escolhida para prosseguir com os estudos.

Para isso, foram avaliadas a incorporação de diferentes concentrações de CMC à formulação contendo CLN2, levando em consideração o diâmetro hidrodinâmico das partículas e o índice de polidispersividade, além de parâmetros reológicos e a estabilidade das formulações.

Uma formulação foi escolhida e avaliado o impacto da incorporação dos carreadores lipídicos no sistema de gel fluido na permeação cutânea. Além disso, também foi avaliada a influência da massagem no momento da aplicação cutânea.

Ao final, a formulação selecionada foi utilizada nos experimentos *in vivo* em camundongos C57BL/6. Nesta etapa, células de melanoma metastático B16-F10 foram transplantadas em camundongos de 5 a 8 semanas de idade e, então, avaliado o perfil de segurança da formulação desenvolvida e a sua ação terapêutica sobre o desenvolvimento do tumor.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 5.1. Material

Ibrutinibe (1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]-1-piperidinyl]-2-propen-1-one, >99.9%) foi obtido da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). O ácido esteárico, ácido oleico e o óleo mineral foram comprados da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Lecidina de soja S100 e o polissorbato 80 foram comprados da Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha) e Merk (Darmstadt, Alemanha), respectivamente. Óleo de semente de romã foi adquirido da Distrol (São Paulo, Brasil). Fosfato de sódio dibásico e o fosfato de sódio monohidratado foram comprados da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), e a carboximetilcelulose foi obtida da Labsynth (Campinas, Brasil).

A membrana sintética de celulose utilizada nos ensaios de liberação foi comprada da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A fita Scotch n. 845 Book Tape utilizada na técnica de *tape-tripping* foi obtida da 3M (St. Paul, MN, USA). Os marcadores 5-doxyyl-stearic acid (5-DSA) e 3-DOXYL-17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstane (ASL) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e 1-palmitoyl-2-stearoyl-(5-DOXYL)-sn-glycero-3-phosphocholine (5-PC) da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA).

As peles de orelha suína foram obtidas em abatedouro local (Via Carnes, Formosa, Brasil) antes que passagem pelo processo de escalda, enquanto os ovos embrionados foram fornecidos pela Avifran Agroavícola (Planatilna, Brasília) no décimo dia de fertilização. Os ratos Wistar utilizados nos ensaios *in vitro* foram obtidos no biotério da Universidade Federal de Goiás, provenientes de ratos com menos de 24 h de vida. Os camundongos C57BL/6 foram obtidos da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR – Minas Gerais, Brasil). Os anestésicos quetamina e xilazina foram obtidos, respectivamente, da Veteca Laboratórios (São Paulo, Brasil) e da Sespo Indústria e Comércio (São Paulo, Brasil). Dacarbazina foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## 5.2. Preparo das soluções estoques de ibrutinibe

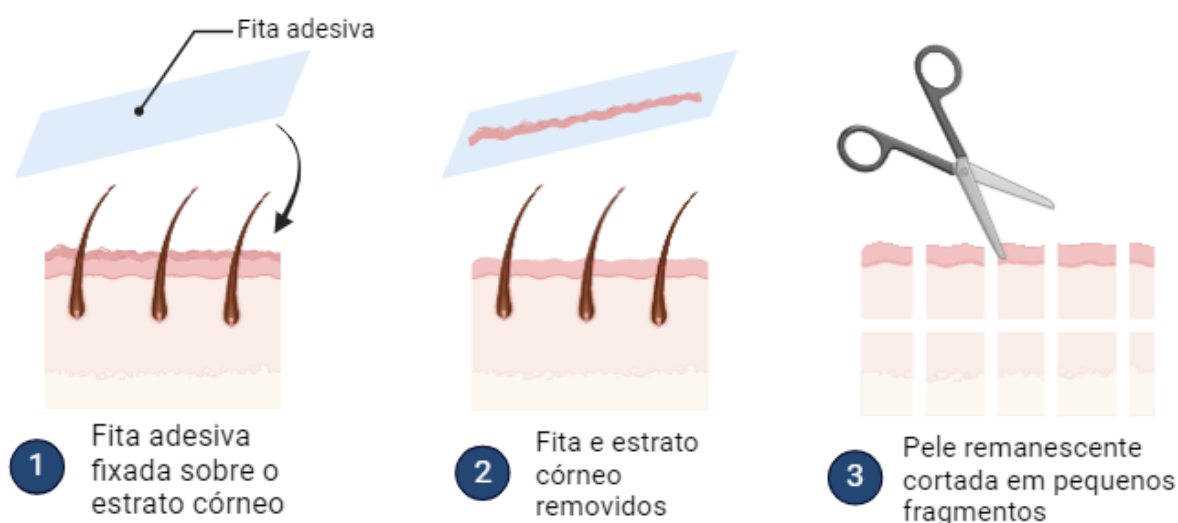
As soluções estoques de ibrutinibe foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, dissolvendo-se 10 mg do fármaco em 10 mL de metanol. Elas foram mantidas a -4°C até o seu uso.

### 5.3. Obtenção da pele suína

Os fragmentos de pele de orelhas suínas utilizados nos experimentos de permeação cutânea foram obtidos em abatedouro local, retirados dos animais antes do processo de escalda e transportados ao laboratório sob refrigeração. No laboratório, a pele foi removida da região externa da orelha com o auxílio de um bisturi e separada do tecido adiposo, muscular e vasos sanguíneos com o auxílio de uma tesoura. Então, a pele foi cortada em círculos de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> e armazenadas a -4°C por um período máximo de 30 dias antes do seu uso.

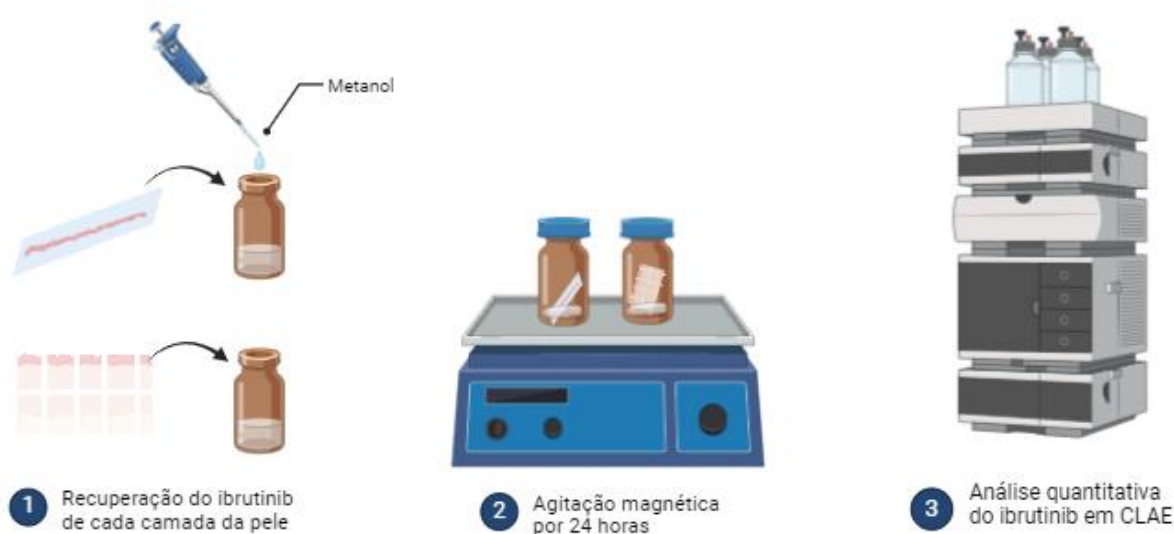
### 5.4. *Tape stripping*

Tanto para os ensaios de validação do método analítico, quanto após o tratamento da pele com as formulações durante os ensaios de permeação cutânea, estrato córneo das peles suínas foram separadas da pele remanescente, que compreende epiderme viável e derme superior, pela técnica de *tape stripping*. Nessa técnica, fragmentos de pele de orelhas suínas são fixadas em suporte com o estrato córneo voltado para cima. O estrato córneo é removido utilizando fitas adesivas, onde cada fita é fixada sobre o estrato córneo e removida com movimento único, repetindo-se o procedimento 15 vezes para cada fragmento de pele. Em seguida, a pele remanescente foi cortada em pequenos fragmentos.



**Figura 7:** Esquema representativo da técnica de *tape-stripping* diferencial. Autoria própria.

Para as extrações de fármaco, cada camada da pele foi colocada, individualmente, em frascos-âmbar com 5 mL de metanol e mantidas sob agitação (300 RPM) por 24 h. Os extratos foram filtrados em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).



**Figura 8:** Esquema representativo do método de extração utilizado para recuperação do ibrutinibe das camadas da pele. Autoria própria.

## 5.5. Método analítico

O ibrutinibe foi analisado quantitativamente por CLAE. O método foi desenvolvido e validado avaliando-se a sua linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, bem como seletividade considerando a presença de interferentes da pele, de acordo com as orientações da ICH Q2B (1996) e Guia nº 10, versão 1, da ANVISA (BRASIL, 2017).

### 5.5.1. Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um método de CLAE de fase reversa (modelo LC-20AD, Shimadzu, Kyoto). A obtenção dos dados, análise e relatórios foram realizados utilizando o *software* Shimadzu LC. Como fase estacionária, utilizou-se uma coluna

de fase reversa C<sub>18</sub> (150 mm x 4,5 mm, 5 µm). A fase móvel foi constituída por acetonitrila e ácido fosfórico (0,01 mol/L). Diferentes gradientes, vazão da fase móvel e temperatura foram testadas, para obtenção da melhor resolução de pico. O ibrutinibe foi detectado por absorção no UV em 359 nm, e o volume de injeção de cada amostra foi de 20 µL.

### 5.5.2. Seletividade

Soluções contendo 7,5 µg/mL de ibrutinibe foram avaliadas em CLAE na ausência e na presença dos contaminantes de cada camada da pele, para avaliar a capacidade de método em quantificar e distinguir o fármaco dos possíveis interferentes. Os contaminantes da pele foram extraídos de cada camada da pele a partir da técnica de *tape stripping*, conforme descrito anteriormente. O ensaio foi repetido seis vezes independentes para cada matriz biológica analisada. Os resultados foram obtidos e analisados considerando as áreas dos picos e o tempo de retenção do fármaco.

### 5.5.3. Linearidade

Três curvas de calibração foram preparadas a partir de três soluções-estoque distintas. Todas as alíquotas foram diluídas em metanol, obtendo uma curva de calibração em concentrações de 0,2 a 15,0 µg/mL de ibrutinibe. As curvas foram plotadas para concentração do fármaco *versus* área do pico, e ajustadas usando regressão linear de mínimos quadrados.

### 5.5.4. Limite de detecção e limite de quantificação

A concentração mínima de ibrutinibe a ser detectada pelo método analítico proposto, mesmo que não quantificado com valor exato, é chamado de limite de detecção (LD). Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do fármaco a ser quantificado com precisão e exatidão. LD e LQ foram determinados com base no desvio padrão e no coeficiente angular da curva de calibração, de acordo com as equações:

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times DP}{IC} \quad (2)$$

Sendo: DP = desvio padrão; e IC = coeficiente angular da curva de calibração.

#### 5.5.5. Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi verificada com três concentrações do ibrutinibe (1,0, 7,5 e 15,0 µg/mL), usando três replicatas de cada concentração. A precisão intermediária foi avaliada com as mesmas concentrações do ibrutinibe, analisando as amostras em dois dias, preparados por dois analistas diferentes. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação (CV), calculado pela equação:

$$CV (\%) = \left( \frac{\sigma}{m\acute{e}dia} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde: CV = coeficiente de variação;  $\sigma$  = desvio padrão da média dos resultados obtidos; e média = média dos resultados obtidos em triplicata para cada amostra analisada.

#### 5.5.6. Exatidão

A exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação de uma concentração conhecida do ibrutinibe nas duas diferentes camadas da pele. Para isso, utilizando a técnica de *tape stripping*, o estrato córneo foi separado da pele remanescente suína e cada camada da pele foi colocada em diferentes frascos-âmbar. A solução de ibrutinibe em metanol foi aplicada em cada camada da pele, com volumes equivalentes a 5,0; 37,5 e 75,0 µg de ibrutinibe. O solvente foi completamente evaporado e 5 mL de metanol foram adicionados em cada frasco, resultando nas concentrações de 1,0, 7,5 e 15,0 µg/mL de ibrutinibe, mantidos sob agitação (300 RPM) por 24 h. Após esse período, os estratos foram filtrados em membrana de 0,45 µm para análise em CLAE. O ibrutinibe recuperado foi determinado pela razão da quantidade de fármaco detectado das diferentes camadas da pele, comparando com o total de fármaco adicionado. Foram realizadas três replicatas para cada concentração e cada camada da pele, e o valor da exatidão foi calculado pela equação:

$$\text{Exatidão (\%)} = \left( \frac{\text{Concentração mensurada}}{\text{Concentração teórica}} \right) \times 100 \quad (4)$$



**Figura 9:** Esquema representativo do processo de contaminação das diferentes camadas da pele com o ibrutinibe e sua extração. Autoria própria.

### 5.6. Análise térmica e teste de solubilidade

Para esse trabalho, foram desenvolvidos dois nanossistemas lipídicos, utilizando óleos que apresentem diferentes interações físico-químicas com o ibrutinibe, a fim de comparar o impacto das interações com o perfil de liberação e permeação cutânea do fármaco. Com esse propósito, foi avaliada a compatibilidade farmacêutica entre o ibrutinibe e diferentes lipídeos selecionados (ácido oleico, óleo mineral e óleo de semente de romã) por meio da análise térmica e a avaliação da solubilidade de ibrutinibe nos lipídeos. A compatibilidade térmica entre o fármaco e os óleos foi realizado utilizando as técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria diferencial (TGA). Posteriormente, foram realizadas as análises DSC e TGA com os demais excipientes individualmente e em misturas físicas binárias com cada excipiente e o ibrutinibe, preparados com razão de massa iguais às composições descritas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Resumo da composição das misturas físicas do ibrutinibe e dos excipientes para avaliação da compatibilidade térmica das formulações.

Mistura	Composição (% m/m)						
	Ibrutinibe	Óleo de romã	Ácido oleico	Óleo mineral	Ácido esteárico	Lecitina de soja	Polissorbato 80
M1	50	50	-	-	-	-	-
M2	50	-	50	-	-	-	-
M3	50	-	-	50	-	-	-
M4	50	-	-	-	50	-	-
M5	50	-	-	-	-	50	-
M6	50	-	-	-	-	-	50
M7	50	12,5	-	-	12,5	12,5	12,5
M8	50	-	12,5	-	12,5	12,5	12,5

As análises de DSC foram realizadas em equipamento DSC-60 (Shimadzu<sup>®</sup>, Tokyo, Japan), com atmosfera controlada de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. Primeiro, aproximadamente 3 mg de ibrutinibe e de cada óleo foi analisado isoladamente, com faixa de temperatura de 25 a 250°C, sob uma taxa de aquecimento de 10°C/min, em placas de alumínio. Em seguida, foram analisadas misturas físicas contendo 50% de ibrutinibe e 50% de cada um dos óleos e cada um dos excipientes selecionados, sob as mesmas condições de análise. As análises TGA foram realizadas em equipamento DTG-60 (Shimadzu<sup>®</sup>, Tokyo, Japan), operado sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min. Também foram analisados o fármaco, os óleos, os demais excipientes, e misturas físicas contendo ambos, com faixa de temperatura de 25 a 500 °C, sob taxa de aquecimento de 10°C/min em placa de platina.

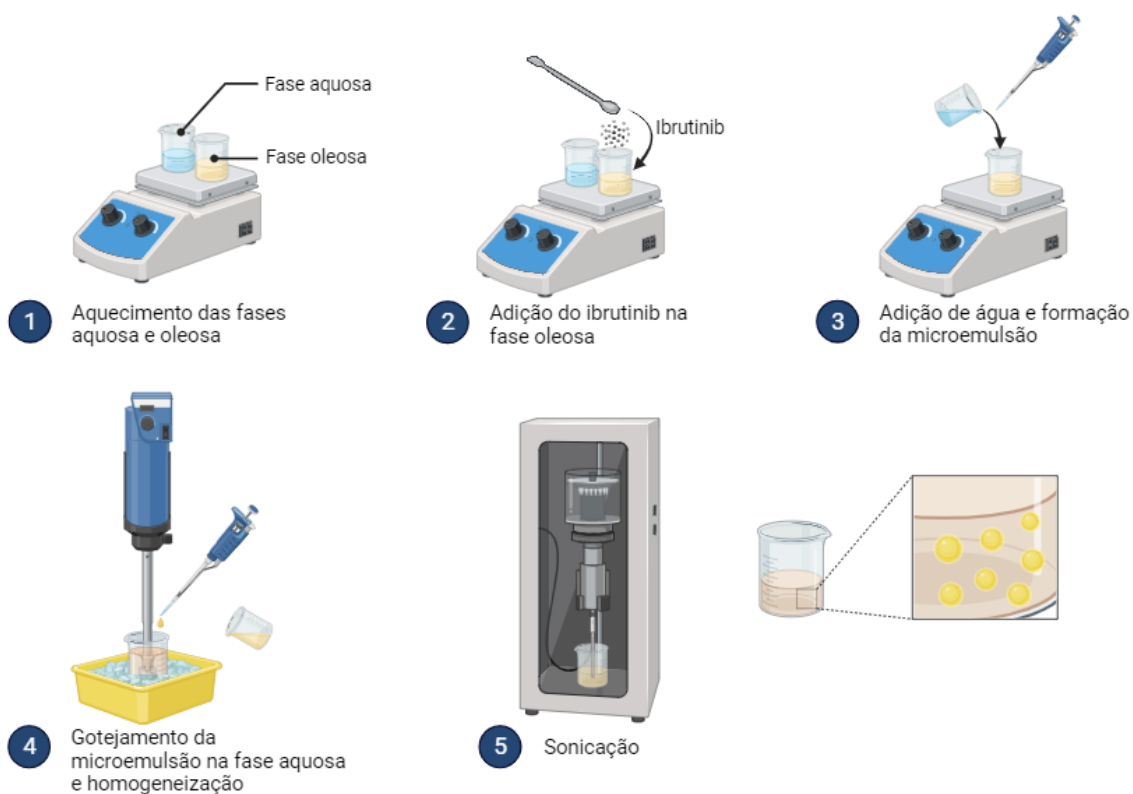
Já o teste de solubilidade foi realizado pela quantificação do fármaco solúvel presente nos óleos saturados com o ibrutinibe. Nesse ensaio, alíquotas de 100 µL de cada óleo foram adicionados em diferentes tubos eppendorf, seguido da adição do fármaco até que se formasse corpo de fundo. Os tubos foram mantidos sob agitação (300 RPM) à temperatura ambiente por 24 h. Caso o fármaco estivesse totalmente solubilizado ao final desse tempo, uma nova quantidade de ibrutinibe era adicionada ao óleo. A mistura de óleo e ibrutinibe era novamente mantida sob agitação novamente por 24 h, e o processo repetido até que houvesse ibrutinibe não-solubilizado na mistura ao final desse tempo, indicando a saturação do óleo. Nesse momento, os tubos eram centrifugados a 2000 G por 10 min, para separar o ibrutinibe excedente

do óleo. Então, uma alíquota de cada óleo era diluída em metanol e mantida sob agitação por 24 h, seguido de filtragem em membrana de 0,45 µm e quantificação do ibrutinibe em CLAE. O estudo foi realizado em triplicata para cada óleo.

Os resultados da compatibilidade térmica e da solubilidade do ibrutinibe nos óleos avaliados foram utilizados como parâmetros para seleção dos óleos utilizados para o desenvolvimento dos dois CLN, sendo escolhidos o óleo de semente de romã e o ácido oleico.

### **5.7. Desenvolvimento das nanoformulações**

Os dois CLN foram preparados pela técnica de dispersão de microemulsão. Para a produção do primeiro CLN (CLN1), uma mistura contendo a fase oleosa (óleo de semente de romã e ácido esteárico) e tensoativos (Tween 80 e lecitina de soja) foram aquecidos a 80°C sob agitação (300 RPM), para garantir completa fusão dos componentes da formulação. Em seguida, foram adicionados 500 µL de água aquecida a 80°C, e o sistema mantido sob constante agitação (500 RPM) por 10 min para formação da microemulsão. Passado esse tempo, a microemulsão foi dispersa na fase aquosa (tampão fosfato, pH 5,5) sob agitação vigorosa em ultra-turrax (13,000 RPM por 15 min), mantido em banho de gelo (5°C). Para redução do tamanho de partículas, a dispersão foi levada à sonicação, em banho de gelo, operado com amplitude de 20%, com pulso contínuo por 15 min.



**Figura 10:** Representação da técnica de preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Autoria própria.

Para obter o nanossistema com menor diâmetro de partícula e menor polidispersividade, diferentes proporções dos componentes da formulação foram testadas, seguindo o delineamento experimental previamente planejado utilizando o *Software Design-expert* versão 12, resultando em 15 corridas independentes. Nesse delineamento, quatro variáveis foram selecionadas: quantidade de óleo de semente de romã, de ácido esteárico, de lecitina de soja e de Tween 80, todas variando entre 50 e 500 mg, conforme descrito na Tabela 2. Já o volume final foi sempre ajustado para 15 mL de formulação com a fase aquosa. Por fim, o sistema com menor diâmetro de partícula e menor polidispersividade foi selecionado e, a partir dele, um novo delineamento experimental foi realizado, com novas 12 corridas, com as variáveis: tempo de ultra-turrax (de 5 a 15 min) e tempo de ultrassonicação (de 5 a 15 min).

**Tabela 2:** Resumo da quantidade dos excipientes selecionados para desenvolvimento do CLN1.

Corrida	Composição (mg)			
	Óleo de romã	Ácido esteárico	Lecitina de soja	Polissorbato 80
1	50	500	500	500
2	275	275	275	275
3	50	500	50	500
4	500	500	50	50
5	50	500	500	50
6	275	653	275	275
7	275	275	275	275
8	50	50	50	50
9	275	275	275	275
10	500	500	500	50
11	500	500	500	50
12	275	275	653	275
13	275	275	275	653
14	275	275	275	275
15	275	275	275	275

O segundo CLN (CLN2) foi obtido pelo aquecimento da mistura contendo a fase oleosa (ácido oleico e ácido esteárico) e tensoativos (Tween 80 e lecitina de soja) a 80°C sob agitação constante (300 RPM) até completa fusão dos componentes da formulação, seguido da adição de água (500 µL) a 80°C, sob agitação constante, para formação da microemulsão. A microemulsão foi, então, dispersa na fase aquosa (tampão pH 5,5) sob agitação vigorosa (13.000 RPM) por 5 min em UltraTurrax, mantido em banho de gelo. Em seguida, a dispersão foi levada à sonicação, operado em amplitude de 20%, com pulso contínuo por 5 min. Para a obtenção do nanossistema com menor diâmetro de partícula e menor polidispersividade, diferentes proporções dos componentes da formulação foram testadas, seguindo o delineamento experimental previamente planejado utilizando o *Software Design-expert* versão 12, resultando em 15 corridas independentes, conforme descrito na Tabela 3. Nesse delineamento, quatro variáveis foram selecionadas: quantidade de ácido oleico, de ácido esteárico, de lecitina de soja e de Tween 80, todas variando entre 50 e 500 mg. Já o volume final foi sempre ajustado para 15 mL de formulação com a fase aquosa.

**Tabela 3:** Resumo da quantidade dos excipientes em mg selecionados para desenvolvimento do CLN2.

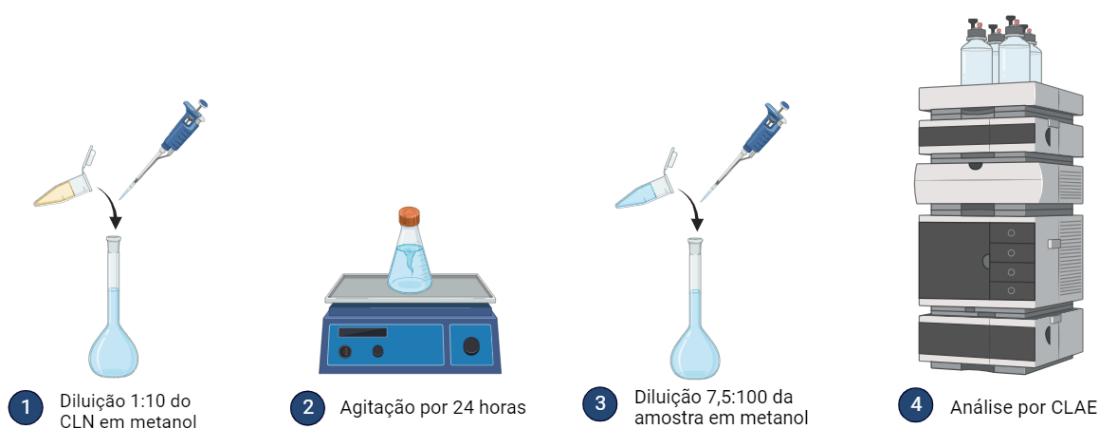
Corrida	Composição (mg)			
	Ácido oleico	Ácido esteárico	Lecitina de soja	Polissorbato 80
1	50	500	500	500
2	275	275	275	275
3	50	500	50	500
4	500	500	50	50
5	50	500	500	50
6	275	653	275	275
7	275	275	275	275
8	50	50	50	50
9	275	275	275	275
10	500	500	500	50
11	500	500	500	50
12	275	275	653	275
13	275	275	275	653
14	275	275	275	275
15	275	275	275	275

Os sistemas com menores tamanhos médios de partícula e menor índice de polidispersividade foram selecionados para incorporação do ibrutinibe. Para cada CLN contendo o fármaco, a mistura de lipídeos e tensoativos foi aquecida a 80°C sob agitação constante (300 RPM), até completa fusão com componentes da formulação. Após, foram adicionados ao sistema 15 mg de ibrutinibe, mantendo a mistura sob aquecimento e agitação, por cerca de 10 min, até completa dissolução do fármaco. Em seguida, foi adicionado 500 µL de água aquecida a 80°C, e o sistema mantido sob constante agitação (500 RPM) por 10 min para formação da microemulsão. A microemulsão foi então dispersa na fase aquosa sob agitação vigorosa em ultra-turrax e submetida à ação do ultrassonicador de ponta, assim como descrito anteriormente.

## 5.8. Caracterização das nanoformulações

Os CLN desenvolvidos foram caracterizados considerando o diâmetro médio de partícula e índice de polidispersividade por espalhamento de luz dinâmica em equipamento ZetaSizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

O teor de fármaco total na formulação foi analisado quantitativamente por CLAE. Para isso, uma amostra de cada formulação foi solubilizada em metanol (1:10 v/v) e mantida sob agitação por 24 h, para completa desestabilização dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Em seguida, as amostras foram novamente diluídas em metanol (75:1000 v/v), filtradas e quantificadas em CLAE.

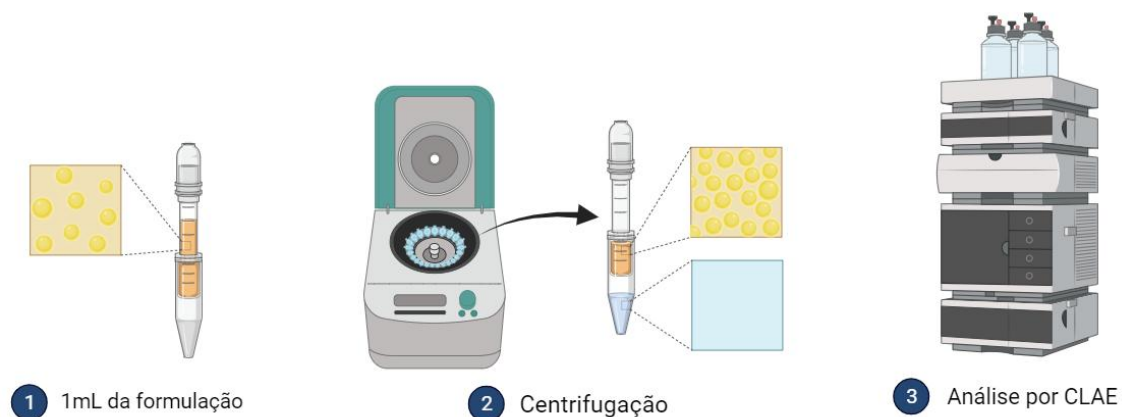


**Figura 11:** Representação do protocolo de quantificação do ibrutinibe total na formulação. Autoria própria.

Já a eficiência de encapsulação do fármaco nos CLN foi determinada pela análise de ibrutinibe recuperado do meio aquoso externo por ultrafiltração em relação ao teor total de fármaco. Para isso, uma alíquota de 1 mL da formulação foi transferida para um dispositivo com tamanho de poro definido em 10 kDa (Vivaspin 2, 100000, MWCO HY, Sartorio, Goettingen, Alemanha). As amostras foram centrifugadas por 30 min a 2700 G. Ao final, o filtrado foi analisado quantitativamente por CLAE. A quantidade de ibrutinibe encapsulado no CLN foi determinado pela diferença entre o teor total de fármaco na formulação e a concentração de fármaco livre no filtrado, seguindo a equação:

$$EE = \frac{IT - IL}{IT} \times 100 \quad (5)$$

Sendo EE = eficiência de encapsulação; IT = ibrutinibe total quantificado nas formulações; e IL = ibrutinibe livre no meio aquoso, recuperado por ultracentrifugação.



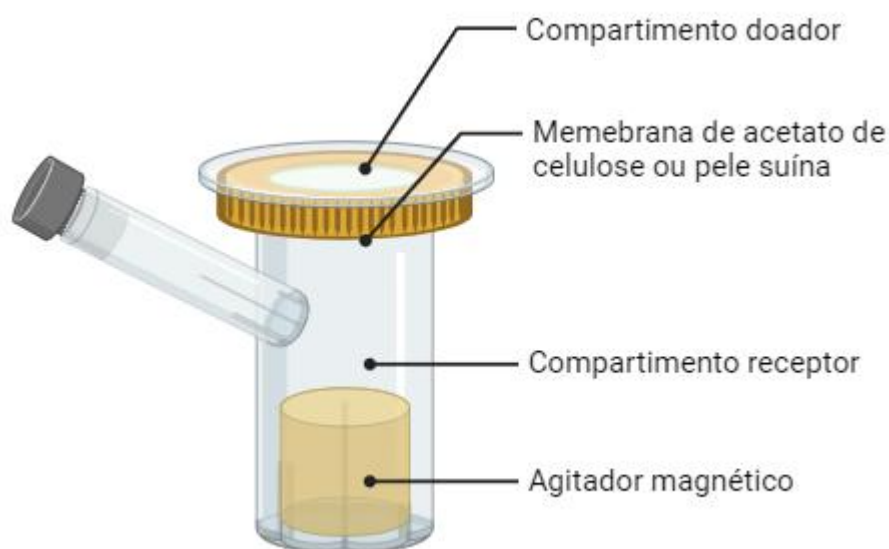
**Figura 12:** Representação do protocolo de quantificação do Ibrutinibe livre com dispositivo com tamanho de poro definido. Autoria própria.

A caracterização morfológica dos CLN desenvolvidos foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em microscópio JEM-1011 (JEOL, Japão), no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) do Instituto de Biologia (IB) – UnB. O preparo das amostras deu-se pela diluição prévia dos CLN em água destilada, na proporção de 1:1000 (v/v). Depois, 20  $\mu\text{L}$  das amostras foram depositadas sobre grades de cobre revestidas com resina “formvar” e mantidas em temperatura ambiente por 10 min. O excesso de amostra foi removido com papel filtro. Após, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de acetato de uranila (3%) para coloração das amostras. O corante foi mantido nas amostras por 10 min, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e, em seguida, removido o excesso com papel filme. As amostras foram levadas ao equipamento e analisadas em aumentos de até 20.000 vezes.

### 5.9. Estudos *in vitro* de liberação

Os ensaios de liberação foram realizados *in vitro* com ambos os nanossistemas desenvolvidos e comparados à difusão do ibrutinibe livre em gel. Células de difusão verticais do tipo *Franz* foram montadas com membrana de acetato de celulose previamente lavadas entre o compartimento doador e o receptor. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução de 30% de etanol em tampão fosfato (pH 7,4), para assegurar que as condições *skin* fossem mantidas. No compartimento doador, foi colocado sobre a membrana de acetato de celulose, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  dos nanossistemas ou 500  $\mu\text{g}$  do gel, usado como controle.

O experimento foi mantido em banho aquecido a  $32 \pm 2^\circ\text{C}$ , e o meio receptor mantido sob agitação constante (500 RPM) por um período de 24 h. Nos tempos 1, 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 e 24 h, alíquotas de 1 mL do meio receptor eram removidas, e um volume igual da solução de 30% de etanol em tampão fosfato (pH 7,4) era imediatamente reposta. Cada alíquota do meio receptor era filtrada em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  e o ibrutinibe quantificado em CLAE. Para avaliação, a porcentagem de fármaco liberado foi calculada em relação ao total de fármaco depositado no compartimento doador para cada amostra em função do tempo.



**Figura 13:** Célula de Franz. Autoria própria.

### 5.10. Estudo *in vitro* de permeação em pele suína

Os estudos de permeação cutânea foram realizados *in vitro* com ambos os nanossistemas desenvolvidos e com gel contendo ibrutinibe livre como controle. As células de Franz foram montadas com fragmentos de pele suína entre o compartimento doador e o receptor, com o estrato córneo voltado para cima, em contato com o meio doador. O compartimento receptor foi preenchido com 15 mL de solução de 30% de etanol em tampão fosfato (pH 7,4). O experimento foi mantido em aquecimento com malha térmica, de forma que a temperatura da superfície da pele permanecesse estável em  $32 \pm 2^\circ\text{C}$ , e o meio receptor foi mantido sob agitação constante (500 RPM). Sobre a superfície da pele, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  das nanoformulações ou 500  $\mu\text{g}$  do gel, e o experimento foi realizado por 12 e 24 h.

Ao final do experimento, a pele suína foi retirada das células de difusão, lavadas com água destilada para remoção de toda a formulação, secas, esticadas e presas sobre um suporte para separação das camadas da pele pela técnica de *tape stripping*, como descrito anteriormente. As diferentes camadas da pele foram colocadas em frascos-âmbar com 5 mL de metanol, que foram mantidos sob agitação (300 RPM) por 24 h, em temperatura ambiente, para extração do ibrutinibe. Ao final, o extrato foi filtrado em membrana de 0,45 µm e o ibrutinibe quantificado por CLAE, seguindo a metodologia analítica validada.

### **5.11. Determinação das interações entre os CLN e o estrato córneo**

Fragmentos de estrato córneo obtidos de ratos Wistar neonatos com menos de 24 h de idade foram preparados conforme descrito anteriormente<sup>92-95</sup>. O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de animais em pesquisa da Universidade Federal de Goiás - UFG (Número de protocolo: 022/16) e foi conduzido com a colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Antônio Alonso. Resumidamente, após a eutanásia dos animais, suas peles foram removidas e colocadas em um recipiente contendo água destilada. Para isolar o estrato córneo, os fragmentos de pele foram inicialmente colocados por 5 min em um dessecador contendo 0,5 L de hidróxido de amônio. Somente vapor d'água saturado com hidróxido de amônio entrou em contato com a pele. Logo em seguida, os pedaços de pele foram colocados flutuando em água destilada com o lado do estrato córneo voltado para cima (em contato com o ar ambiente) e mantidos assim por 2 h. Após esse período, foram colocados sobre papel de filtro com o lado do estrato córneo em contato com o papel. Usando as pontas dos dedos para aplicar pressão sobre a pele, o estrato córneo foi separado do restante da pele. Os fragmentos de estrato córneo foram lavados em água destilada e colocados sobre uma tela de teflon. As telas foram então colocadas em um dessecador contendo gel de sílica e sob vácuo. Após 24 h, os pedaços de estrato córneo desidratados foram retirados das telas e colocados entre folhas de papel de filtro, mantidas no dessecador com vácuo e gel de sílica até o uso.

O estrato córneo de pele de orelha de porco também foi separado da pele usando o mesmo método. Após a remoção dos pelos e a dermatomização para uma espessura de cerca de ~7 mm, os fragmentos de pele de porco seguiram o mesmo procedimento utilizado para os ratos com uma única alteração no tempo de exposição ao vapor de hidróxido de amônio, que foi aumentado de 5 para 50 min.

Antes do tratamento com as formulações, o estrato córneo foi marcado com os marcadores 5-DSA (5-doxyyl-stearic acid), ASL (3-DOXYL-17β-hydroxy-5α-androstane) e 5-PC (1-palmitoyl-2-stearoyl-(5-DOXYL)-sn-glycero-3-phosphocholine), conforme

metodologia já descrita <sup>92,96</sup>. Resumidamente, uma alíquota contendo 1 µL de 5-DSA foi dissolvido em etanol (3 mg/mL) em uma placa de vidro. Após a evaporação do solvente, a amostra de estrato córneo (~2 mg de peso seco), previamente hidratada em água destilada por 20 min, foi colocada sobre a placa contendo 5-DSA, juntamente com 50 µL de água. Em seguida, foi esfregado suavemente com o auxílio de um bastão de vidro em um suporte, de forma que o estrato córneo fosse passado continuamente sobre o filme de 5-DSA por 5 min.

Após a marcação, o estrato córneo foi tratado com as formulações. Para isso, ele foi introduzido em um tubo de eppendorf contendo 10 ou 20 µL de cada formulação. Usando uma pequena haste metálica, o estrato córneo foi manipulado para ser impregnado pela formulação em ambos os lados. Após um período de incubação de 30 min ou 2 h em um tubo fechado a 25°C, o estrato córneo foi colocado sobre a placa de vidro para ser introduzido em um capilar de vidro com diâmetro interno de 1 mm com o auxílio de uma haste metálica, e o capilar foi selado com chama em um dos lados. Por fim, a ressonância paramagnética eletrônica (EPR) de cada amostra foi avaliada em espectrofotômetro EPR EMX-Plus da Bruker (Rheinstetten, Alemanha). Os espectros foram registrados com as seguintes configurações do instrumento: potência de micro-ondas, 10 mW; frequência de modulação, 100 kHz; amplitude de modulação, 1,0 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s; e temperatura da amostra, 25°C. Os espectros de EPR foram simulados usando o programa de ajuste por mínimos quadrados não lineares (NLLS) <sup>97</sup>.

#### **5.12. Ensaio *in vitro* em membrana cório-alantoide de ovos de galinhas embrionados (HET-CAM)**

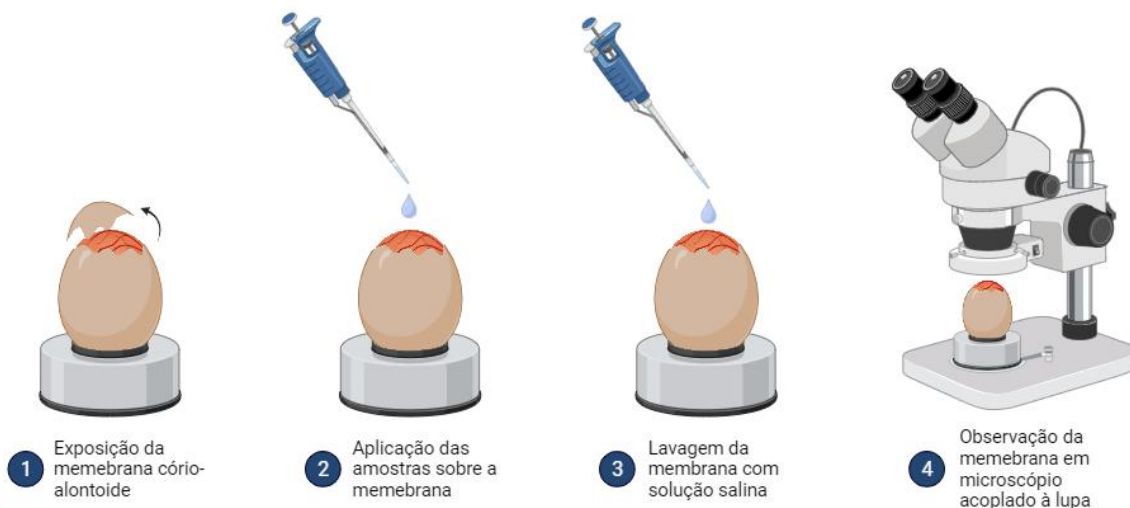
O grau irritativo das nanoformulações foi avaliado pelo ensaio em membrana cório-alantoide em ovos de galinhas embrionados<sup>98</sup>, conforme sugestão da legislação europeia e da Agência de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA) como método para avaliar a segurança de diferentes produtos cosméticos e dermatológicos.

Nesse estudo, foram utilizados ovos embrionados fornecidos pela Pluma Agroavícola (Planaltina, Brasil) no seu décimo dia de incubação. Todo o experimento foi conduzido na data da coleta dos ovos. Primeiro, a casca ao redor da câmara de ar do ovo foi retirada, revelando a membrana da casca. Posteriormente, uma pequena porção da membrana da casca foi cuidadosamente removida, expondo a membrana cório-alantoide. Em seguida, foram adicionados 300 µL das formulações contendo os nanocarreadores, assim como dos controles positivo (NaOH 1mol/L) e negativo (NaCl 0,9%). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra.



**Figura 14:** Exposição da membrana cório-alantoide por meio da remoção de uma pequena porção da casca e da membrana da casca do ovo.

A membrana permaneceu em contato com cada uma das formulações por um período de 20 seg. Após esse intervalo, procedeu-se a uma delicada lavagem da membrana com solução salina, seguida de uma análise de 5 min para observar possíveis alterações fisiológicas, tais como hiperemia, hemorragia e coagulação. Todas essas mudanças foram examinadas em microscópio acoplado a uma lupa, sendo a análise realizada nos tempos de 30 seg, 2 e 5 min.



**Figura 15:** Representação da avaliação *in-vitro* do potencial irritativo da formulação pela técnica HET-CAM. Autoria própria.

O tempo necessário para ocorrência de qualquer um desses eventos (em segundos) foi anotado e o índice de irritabilidade foi calculado de acordo com a equação:

$$II = \frac{(301 - HE) \times 5}{300} + \frac{(301 - HP) \times 7}{300} + \frac{(301 - CO) \times 9}{300} \quad (6)$$

onde: II = índice de irritabilidade; HE = tempo de ocorrência de hemorragia; HP = tempo de ocorrência de hiperemia; e CO = tempo de ocorrência de coagulação.

Após calculado o índice de irritabilidade, cada formulação foi classificada de acordo com a Tabela 4.

**Tabela 4:** Classificação do grau de irritabilidade das formulações no ensaio de HET-CAM.

<b>Índice de irritabilidade</b>	<b>Classificação</b>
0 – 0,9	Não irritante (NI)
1 – 4,9	Irritante leve (IL)
5 – 8,9	Irritante moderado (IM)
9 – 21	Irritante severo (IS)

### **5.13. Incorporação do CLN2 em géis fluidos e caracterização**

Após a realização dos ensaios descritos anteriormente, a formulação contendo CLN2 foi selecionada para dar prosseguimento ao estudo. Como a etapa final envolve a avaliação *in vivo* da aplicação tópica da formulação desenvolvida em modelo de melanoma metastático em camundongos, a incorporação das partículas em um sistema de gel-fluido garantiria as características necessárias para a aplicação da formulação.

Para isso, formulações contendo CLN2 foram, primeiramente, preparadas conforme descritas anteriormente (Seção 4.7). Em seguida, foram adicionadas 0,25%, 0,5%, 0,75% ou 1% de carboximetilcelulose (CMC) do volume final das formulações e mantidas sob agitação, em temperatura ambiente, por 12 h, até completa solubilização do CMC.

Os géis fluidos desenvolvidos foram caracterizados considerando o diâmetro médio de partícula e polidispersividade por espalhamento de luz dinâmica em equipamento ZetaSizer Nano (NANO ZS90, Malvern, Worcestershire, Reino Unido), conforme metodologia descrita anteriormente (Secção 4.8).

### **5.14. Estudo de estabilidade dos géis fluidos**

A estabilidade física dos hidrogéis contendo CLN2 (CLN2-gel) foram avaliadas seguindo as normas descritas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária na RDC 318/2019 (BRASIL, 2019). Para isso, alíquotas contendo os sistemas de hidrogéis foram armazenados em tubos cônicos fechados, protegidos da luz com papel alumínio, mantidos em duas condições diferentes de temperatura, de  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  e  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ao experimento, foi adicionado um controle, composto pela formulação CLN2 em dispersão aquosa. Durante os intervalos pré-determinados (0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias), essas alíquotas foram analisadas quanto às suas características físicas e químicas, como o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas e índice de polidispersividade. Além disso, foram registradas fotografias das formulações em cada análise. O experimento foi realizado em triplicata para cada formulação e cada condição de estudo.

#### **5.15. Análise reológica de cisalhamento contínuo dos géis fluidos**

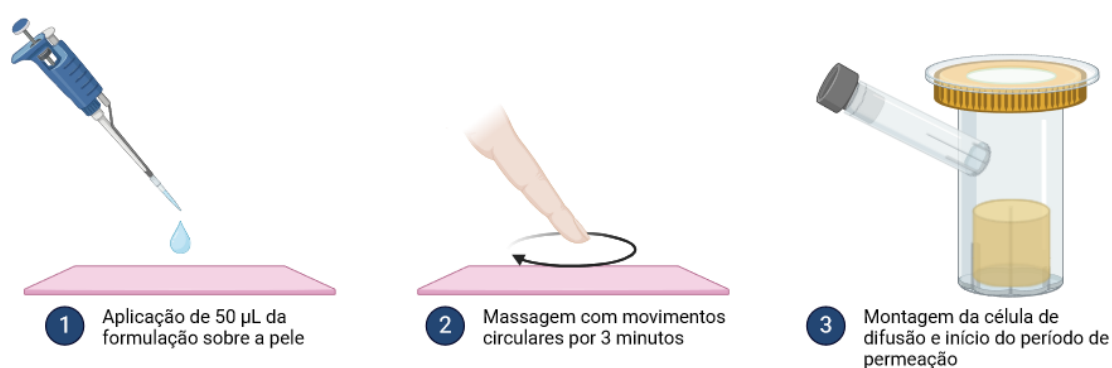
As análises reológicas foram realizadas em reômetro Discovery HR-2 (TA Instruments, Delaware, EUA) com gradiente de tensão e de cisalhamento controlado, em modo de fluxo e equipado com geometria de placa de aço de 40 mm com angulação de 1 grau, com espaço de 50  $\mu\text{m}$  entre os dois. Os reogramas foram obtidos nas temperaturas 25 e  $32^\circ\text{C}$ , para simular as condições de armazenamento de aplicação na superfície da pele, respectivamente. Aproximadamente 1 mL de cada amostra das formulações foram cuidadosamente aplicadas sobre a placa inferior, de forma a evitar o cisalhamento das amostras, e mantidas sob repouso por 5 min. As curvas de fluxo ascendente foram obtidas com gradiente de cisalhamento de 0 a  $500 \text{ s}^{-1}$ , no período de 60 s. Após este período, iniciou-se a curva descendente em condições inversa à ascendente.

#### **5.16. Estudo *in vitro* de permeação cutânea de gel fluido contendo CLN2, com e sem massagem**

A formulação selecionada em gel (CLN2-gel) foi avaliada quanto ao perfil de permeação cutânea *in vitro*, utilizando a formulação CLN2 (nanodispersão aquosa das CLN2) como controle. Para os testes, células de *Franz* foram montadas com fragmentos de pele suína entre o compartimento doador e o receptor, com o estrato córneo voltado para cima, e os experimentos conduzidos pelos tempos de 6, 12 e 24 h, seguindo a metodologia descrita na Seção 4.11. Ensaios adicionais incluíram a aplicação de massagem sobre a pele, simulando as

condições de administração das formulações. Este método mecânico é conhecido por estimular a permeação dos fármacos através do estrato córneo <sup>99</sup>.

No ensaio com massagem, 50 µL de CLN2-gel ou de CLN2 (controle) foram aplicados sobre o estrato córneo de fragmentos de peles suínas de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> e realizados movimentos circulares no sentido horário, com o dedo indicador, por 3 min. Após o tempo de massagem, os volumes das formulações foram completados para 500 µL e conduzido o estudo de permeação *in vitro* pelos tempos de 6, 12 e 24 h.



**Figura 16:** Representação da avaliação *in-vitro* do perfil de permeação cutânea com aplicação de massagem. Autoria própria.

Ao término do experimento, as peles suínas foram retiradas das células de difusão, lavadas com água destilada para remoção de toda a formulação, secas com papel de filtro, esticadas e presas sobre um suporte para separação das camadas da pele pela técnica de *tape stripping*, como descrito anteriormente. As diferentes camadas da pele foram colocadas em frascos-âmbar com 5 mL de metanol, que foram mantidos sob agitação (300 RPM) por 24 h, em temperatura ambiente, para extração do ibrutinibe. Ao final, o extrato foi filtrado em membrana de 0,45 µm e o ibrutinibe quantificado por CLAE, seguindo a metodologia analítica validada.

### **5.17. Estudo *in vivo* do efeito de CLN2-gel no tratamento de melanoma em camundongos C57BL/6**

Foi conduzido um estudo *in vivo* para avaliar o melhor regime de aplicação e efeito terapêutico da aplicação tópica de CLN2-gel em camundongos com melanoma. Inicialmente, um estudo piloto foi realizado para definir o esquema terapêutico inicial da aplicação tópica de

CLN2-gel e estabelecer as condições com outros grupos experimentais submetidos a diferentes esquemas terapêutico. O número de células transplantadas por camundongo, o momento do início do tratamento e a frequência das análises da evolução tumoral foram verificados nessa etapa piloto. Com base nos resultados, foi conduzido o estudo definitivo, no qual os camundongos tratados com CLN2-gel foram comparados a outros controles.

#### **5.17.1. Cultura celular e camundongos**

Células de melanoma metastático B16-F10 (ATCC® CCL-6475™), modificadas para a expressão de luciferase, foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco® Life Technologies, Ltd., USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco® Invitrogen™, USA), 100 UI/mL de penicilina e 100 UI/mL de estreptomicina (Sigma – Aldrich). As células foram mantidas em incubação em câmara úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idade entre 14 e 15 semanas e peso médio de 25,5 g, foram obtidos na Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais (REBIR-UFU). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ambiente e ciclo de luz/escuro de 12 h, com dieta balanceada, acesso livre à água. Foram alojados em gaiolas com três animais em cada, equipado com sistema de ventilação adequado. Todos os procedimentos experimentais foram realizados após um período de aclimatação dos animais às condições de laboratório por uma semana, em conformidade com as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Brasília, Brasil (CEUA: 23106.053905/2024-85; ANEXO 1)

#### **5.17.2. Transplante das células B16-F10 e avaliação do efeito terapêutico de CLN2-gel em camundongos com melanoma**

Inicialmente, foi realizado um estudo piloto, com o objetivo de determinar o número de células transplantadas para indução do melanoma em camundongos, bem como determinar o regime terapêutico. Essa etapa foi essencial, pois esse trabalho investiga uma abordagem terapêutica inovadora para a administração tópica de ibrutinibe em modelos de melanoma. Além disso, a realização do estudo piloto foi necessária devido à ausência de consenso na

literatura sobre o número de células B16-F10 a serem transplantadas e ao padrão de crescimento do tumor durante a indução do melanoma metastático em camundongos C57BL/6<sup>100-103</sup>.

Portanto, após a observação dos padrões de crescimento tumoral, estabeleceu-se que o número de células transplantadas seria de  $2,5 \times 10^4$  células/camundongo. Definiu-se também que a avaliação do crescimento tumoral, tanto por meio do sistema de imagem *in vivo* (IVIS-Lumina) quanto pela medição do tamanho do tumor com o auxílio de um paquímetro, seria realizada em dias alternados, a partir do terceiro dia após o transplante das células. Além disso, o início do tratamento foi determinado para ocorrer após o diagnóstico clínico ou laboratorial do melanoma no primeiro camundongo, independente do grupo experimental. Essa estratégia foi adotada para simular um cenário clínico em que o tratamento é iniciado nos estágios iniciais do desenvolvimento do melanoma.

Para este fim, os camundongos foram submetidos à tricotomização local 24 h antes do transplante das células. Para isso, os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 80 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina. Após a confirmação do estado anestésico, a tricotomia deu-se inicialmente por máquina de corte, seguido da aplicação do creme depilatório DepiRoll®. Após a tricotomia, os camundongos permaneceram sob observação até o retorno do estado anestésico.

Um dia após tricotomização local,  $2,5 \times 10^4$  células B16-F10 foram ressuspensas em 50 µL de tampão fosfato de sódio (PBS) e transplantadas no tecido subcutâneo da região dorsal dos camundongos (n=5), área selecionada devido à dificuldade de os camundongos removerem as formulações tópicas após a aplicação. Para isso, os camundongos foram anestesiados com isoflurano 2% em câmara anestésica. Após o transplante, os camundongos foram divididos em oito grupos, conforme descrito na Tabela 5.

*Tabela 5: Grupos experimentais para avaliação do efeito terapêutico de CLN2-gel em camundongos com melanoma*

<b>Grupo</b>	<b>Identificação</b>	<b>Tamanho amostral</b>
G1	Sem tumor	5
G2	Tumor tratado com CLN2-gel	5
G3	Tumor tratado com CLN sem ibrutinibe (placebo)	5
G4	Tumor tratado com gel contendo ibrutinibe livre	5
G5	Tumor tratado com dacarbazina	5
G6	Tumor tratado com ibrutinibe por via oral	5
G7	Tumor tratado com terapia combinada (dacarbazina + CLN2-gel)	5

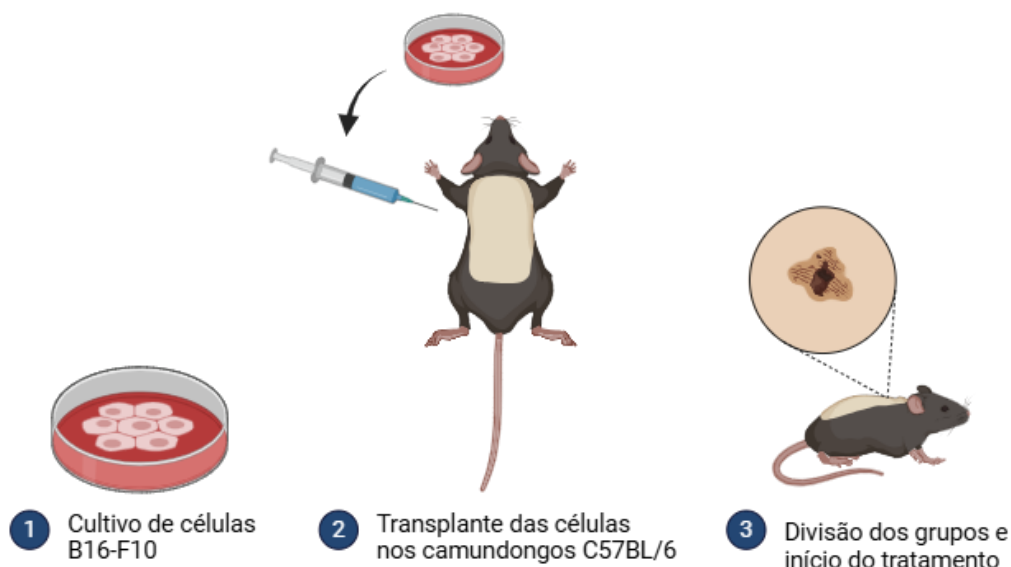
A partir do terceiro dia após o transplante, o desenvolvimento tumoral foi analisado em dias alternados com o sistema de imagem *in vivo* IVIS Lumina® XR Série III (PerkinElmer, EUA), utilizando o *software* Living Image®, versão 4.5.4, seguindo as instruções do fabricante. Para aquisição das imagens, 100 µL de solução contendo liciferina 1 mM (Promega, WI, EUA) foram injetados intraperitonealmente nos camundongos, que permaneceram sob monitoramento por 20 min no sistema IVIS Lumina®, sob anestesia com isofurano a 2,5% (Instituto BioChimico, Brasil). Os sinais de imagem de bioluminescência, proporcionais ao número de células B16-F10, foram registrados a cada minuto como unidade de luminescência (fótons/s/cm<sup>2</sup>).

Após a análise por IVIS Lumina, cada camundongo era fotografado para registro visual da evolução do tumor. Nas avaliações iniciais, após o transplante, também era realizado a palpação do local do transplante, para detecção clínica do tumor. Quando diagnosticado, era realizada a medição de cada tumor com o auxílio de um paquímetro, processo repetido a cada dois dias, junto com a análise por IVIS Lumina. O tratamento foi iniciado assim que o tumor se tornasse clinicamente detectável, de acordo com o protocolo terapêutico estabelecido para cada grupo experimental. Com base nas medições, foi calculado o volume tumoral estimado, utilizando a fórmula:

$$V = \frac{C \times L^2}{2} \quad (7)$$

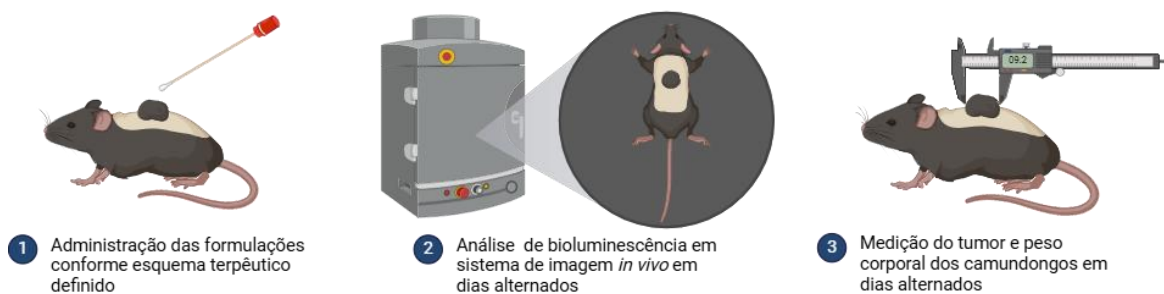
Onde: V = volume tumoral estimado; C = comprimento (maior medida aferida); L = largura (menor medida aferida).

Para a análise dos dados, foi realizada a normalização dos volumes tumorais estimados. Para isso, calculou-se a razão entre o volume tumoral medido em cada análise e o volume tumoral do mesmo camundongo no dia do diagnóstico. Exemplificando: se o tumor de um determinado camundongo apresentava volume de 10 mm<sup>3</sup> no dia do diagnóstico e 250 mm<sup>3</sup> no 13º dia após o transplante celular, então o valor normalizado representado graficamente para esse dia seria 25 (250/10). O objetivo dessa normalização é evitar variações absolutas de tamanho entre os animais e focar no crescimento relativo dos tumores ao longo do experimento.



**Figura 17:** Representação do transplante celular e diagnóstico clínico do melanoma em camundongos. Autoria própria.

Ao experimento, foi adicionado um grupo sem tumor, utilizado para obtenção de dados basais dos camundongos. Além disso, foi incorporado um grupo tratado com dacarbazina, considerada tratamento de referência para melanoma, administrada por via intraperitoneal em dias alternados na dose de 80 mg/kg, conforme descrito na literatura<sup>104,105</sup>. Os grupos submetidos ao tratamento tópico incluíram camundongos recebendo CLN2-gel, CLN2-gel sem ibrutinibe (placebo) e gel contendo ibrutinibe livre, com administração diária de 200  $\mu$ L de formulação. Adicionalmente, foi acrescentado um grupo tratado com ibrutinibe por via oral, seguindo dose de 25 mg/kg, em veículo formado por 0,5% de metilcelulose, 1% de lauril sulfato de sódio e 10% de sorbitol, conforme descrição na literatura para outros modelos de tumores sólidos<sup>106,107</sup>. Por fim, um grupo submetido à terapia combinada recebeu a administração tópica diária de CLN2-gel associada à administração intraperitoneal de dacarbazina (80 mg/kg) em dias alternados.



**Figura 18:** Representação do tratamento tópico, análise por IVIS-Lumina e monitoramento da progressão do melanoma em camundongos. Autoria própria.

Todos os camundongos foram eutanasiados com sobredose de anestésico intraperitoneal seguido de punção cardíaca (exsanguinação) quando pelo menos um tumor, em qualquer grupo, atingiu o tamanho máximo de 1000 mm<sup>3</sup>, aproximadamente<sup>108</sup>. Também foi estabelecido um ponto final humanitário, prevendo a eutanásia dos camundongos caso apresentassem uma redução de 20% da massa corporal; escore de condição corporal inferior a 2, em uma escala de 5; carga tumoral acima de 10% do peso corporal; tumor com dimensão superior a 2 cm em qualquer direção; se o tumor interferir na capacidade acessar ou ingerir alimento, beber água ou deambular; se o tumor estivesse causando dor significativa que não pudesse ser aliviada por analgésico; ou caso o tumor apresentasse sinais de necrose, úlcera ou infecção, avaliado por médico veterinário.

Após a eutanásia, foi realizado o registro fotográfico dos tumores, bem como realizada a medição dos tumores para comparação da evolução do melanoma nos diferentes grupos. O volume dos melanomas após a excisão dos tumores foi realizado utilizando a fórmula:

$$V = \frac{\pi}{6} \times C \times L \times A \quad (8)$$

Onde V = volume tumoral; C = comprimento (maior medida aferida); L = largura (menor medida aferida); e A = altura.

### 5.18. Análise estatística

A construção dos reogramas foi realizada com o *software* Trios 5.5. A representação gráfica dos ensaios de liberação, permeação e estabilidade foram elaborados no Microsoft Excel 2016, enquanto a representação da superfície de resposta foi gerada utilizando o *software* DesignExpert 11. Cromatogramas, termogramas e demais representações gráficas foram

obtidas com o GraphPad Prism 8.0.1, o qual também foi empregado para a análise estatística e tratamento dos dados. As análises comparativas foram realizadas por ANOVA, e o Teste t de *Student* foi utilizado para comparação de amostras dependentes e independentes. O nível de significância estatística foi aceito como  $p < 0,05$ .

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

### 6.1. Estabelecimento das condições cromatográficas

Embora seja reportado na literatura diferentes métodos para detecção e quantificação do ibrutinibe por CLAE-MS/MS, poucos trabalhos propõem a sua quantificação por CLAE-UV. Além disso, não está descrito na literatura científica um método para detecção e quantificação do ibrutinibe nas diferentes camadas da pele, que fosse validado em termos da seletividade, linearidade, precisão e exatidão. Com isso, o primeiro passo deste estudo foi desenvolver um método analítico simples e seletivo para a detecção do ibrutinibe, com uma metodologia que fosse capaz de dar suporte para o desenvolvimento de uma formulação dermatológica contendo esse fármaco, levando em consideração tanto os testes realizados em pele suína.

Devido à baixa polaridade do ibrutinibe ( $\log P = 3,97$ )<sup>25</sup>, foi selecionada uma coluna de fase reversa C18. Cada condição cromatográfica testada está resumida na Tabela 6. Os cromatogramas e o tempo de retenção do ibrutinibe foi analisado em cada condição testada. Como o método proposto foi utilizado para testes de permeação em pele suína, era necessário que o pico do ibrutinibe não possuísse interferência dos picos dos constituintes endógenos das peles.

**Tabela 6:** Condições cromatográficas avaliadas durante o desenvolvimento do método CLAE-UV para detecção e quantificação do ibrutinibe.

Ensaio	Fase móvel (v/v)	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Temperatura (°C)	Tempo de retenção (min)	Resultado
1	Acetonitrila: Ácido fosfórico 0,01 mol/L 40:60	1,0	20	30	5,260	Picos sobrepostos
2	Acetonitrila: Ácido fosfórico 0,01 mol/L 35:65	1,0	20	30	8,716	Picos sobrepostos
3	Acetonitrila: Ácido fosfórico 0,01 mol/L 35:65	1,0	10	30	8,921	Picos sobrepostos
4	Acetonitrila: Ácido fosfórico 0,01 mol/L 35:65	1,0	20	35	8,881	Pico adequado

Inicialmente, uma fase móvel composta por 40% de acetonitrila e 60% de ácido fosfórico foi testada. No primeiro teste, uma alíquota de 20 µL da solução estoque de ibrutinibe foi injetada na coluna e o forno foi mantido a 30 °C. Sob essas condições, o ibrutinibe eluiu

precocemente (5,3 min), o que não garantiu sua separação total dos agentes interferentes da pele, que eluíram entre 3,6 min e 4,7 min. A proporção de acetonitrila da fase móvel foi então reduzida para 35% para diminuir a força da fase móvel, o que aumentou o tempo de eluição do ibrutinibe para 8,7 min. No entanto, a separação ainda não se mostrou eficiente, pois alguns picos sobrepostos ainda foram observados. Assim, uma redução no volume de injeção da amostra (de 20 para 10  $\mu\text{L}$ ) foi testada inicialmente, mas não gerou resultados significativos. Conseqüentemente, foi decidido não manter essa redução, dada a ausência de melhorias perceptíveis.

Em seguida, a temperatura do forno foi aumentada em 5°C para reduzir a viscosidade da fase móvel. Essa última medida obteve eficientemente um pico de ibrutinibe bem resolvido, que eluiu em 8,9 min. O número de pratos teóricos obtidos foi de 8.906 e o fator de cauda foi de 1,2, o que indica um método cromatográfico adequado<sup>69</sup>. Essa variação no tempo de retenção é esperada, uma vez que mudanças na polaridade da fase móvel podem aumentar ou diminuir a interação entre o analito e a fase estacionária. No caso do ibrutinibe, suas características hidrofóbicas levam a uma redução no tempo de retenção ao utilizar solventes orgânicos com menor polaridade, como a acetonitrila<sup>109-111</sup>. Além disso, espera-se que o aumento da temperatura melhore a fluidez da fase móvel, o que pode resultar em melhor separação dos picos<sup>109-112</sup>.

Portanto, foi proposto um método utilizando coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (150 mm x 4,5 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), com uma fase móvel composta por acetonitrila e água acidificada (ácido fosfórico 0,01M) na proporção de 35:65 (v/v). A vazão foi de 1,0 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 20  $\mu\text{L}$ , o forno mantido na temperatura de 35°C e a detecção do fármaco realizada em 359 nm, apresentando tempo médio de retenção do ibrutinibe em 8,9 min.

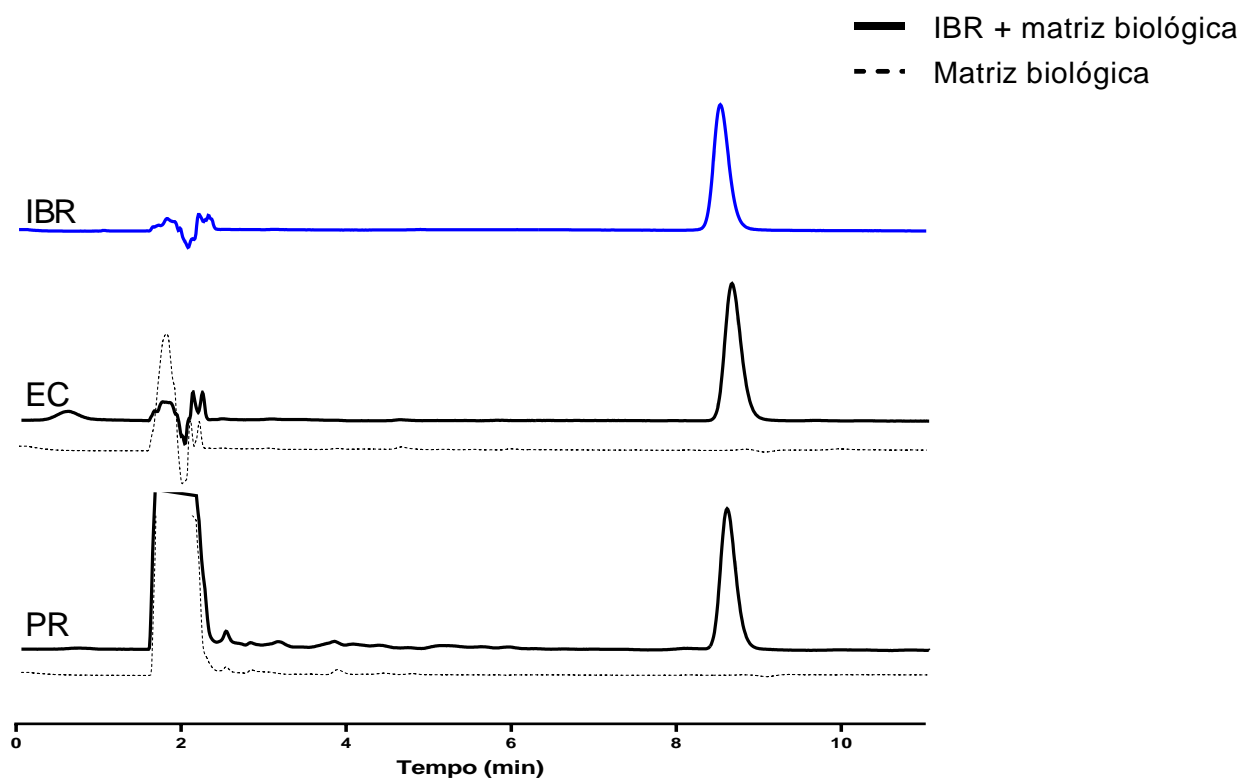
Procedeu-se então à validação deste método.

### **6.1.1. Seletividade**

A seletividade é a capacidade de um método analítico em distinguir o fármaco dos possíveis contaminantes presentes na amostra. É essencial enfatizar a complexidade dessas matrizes biológicas, pois cada camada da pele possui uma composição distinta. Os extratos obtidos do estrato córneo contêm ceramidas, ácidos graxos e colesterol, enquanto a pele remanescente exibe diversos contaminantes da matriz extracelular<sup>68</sup>. Conseqüentemente, um método versátil que possa detectar de forma confiável o ibrutinibe em diferentes matrizes biológicas é indispensável para experimentos de permeação.

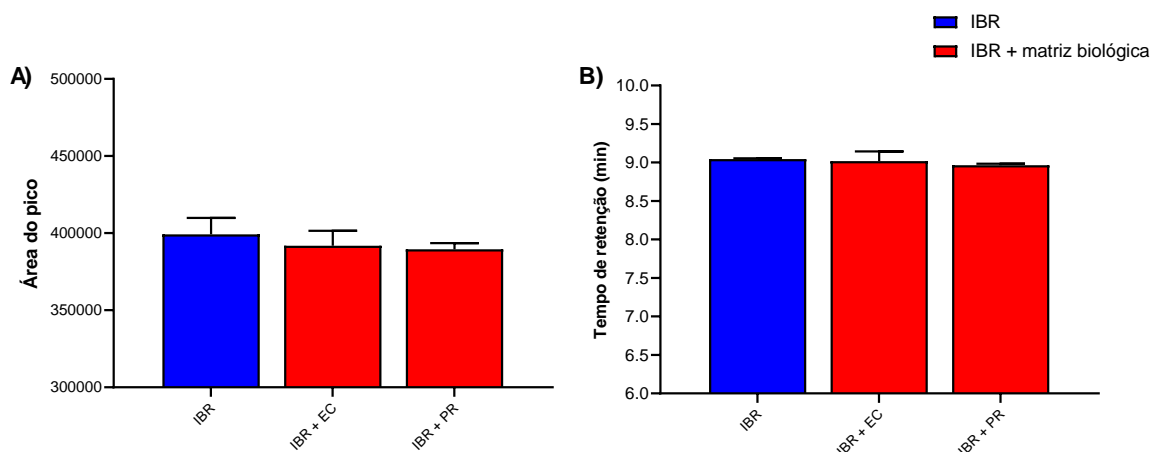
Para avaliar esse parâmetro, amostras contendo uma concentração conhecida de ibrutinibe foram contaminadas com as soluções metanólicas obtidas das diferentes camadas da pele, de forma que a concentração teórica de ibrutinibe nas amostras fosse de 7,5 µg/mL.

Nos cromatogramas, é possível observar que não há presença dos contaminantes de cada camada da pele no tempo de retenção do ibrutinibe (Figura 19).



**Figura 19:** Representação cromatográfica das análises em CLAE do ibrutinibe (7,5 µg/mL) na presença dos contaminantes da pele. IBR: ibrutinibe; EC: estrato córneo; PR: pele remanescente.

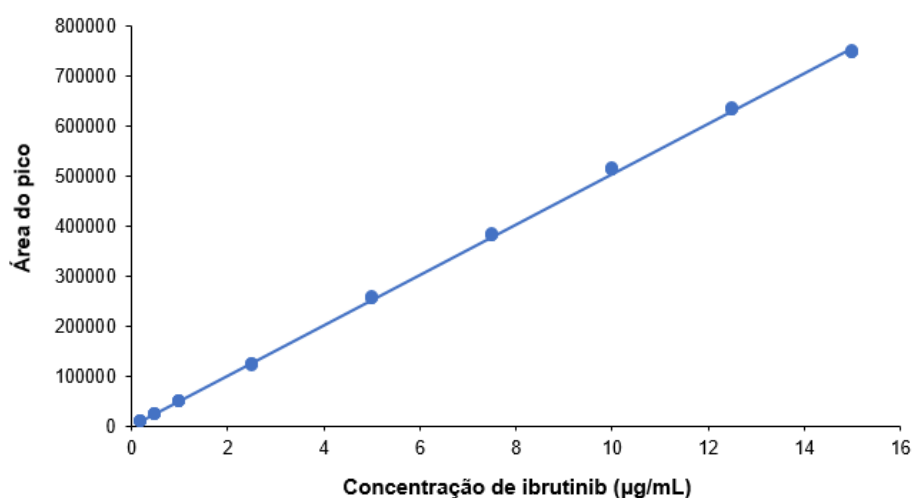
Além disso, a Figura 20A mostra que os contaminantes da pele não causaram alterações significativas na área do pico do ibrutinibe ( $p=0,2730$ , ANOVA). Igualmente, na Figura 20B, é observado que os contaminantes não causaram diferenças marcante no tempo de retenção do fármaco ( $p=0,1410$ , ANOVA), o que garante a seletividade do método analítico. Todos os coeficientes de variação do analito na presença dos contaminantes foram inferiores ao limite de 15% estabelecido pelos órgãos internacionais de validação para métodos bioanalíticos.



**Figura 20:** Seletividade do método para a quantificação do ibuprofeno. Não houve diferença estatística entre o ibuprofeno isolado (7,5 µg/mL) e adicionado dos extratos da pele em relação à (A) área do pico ( $p=0,2370$ , ANOVA) e (B) tempo de retenção ( $p=0,1410$ , ANOVA). IBR = ibuprofeno; EC = extrato córneo; PR: pele remanescente.

### 6.1.2. Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico de obter respostas diretamente proporcionais à concentração de um analito em meio a uma amostra. As curvas analíticas para o ibuprofeno estão representadas na Figura 21. As áreas dos picos plotadas em relação à concentração de ibuprofeno foram consideradas lineares na faixa de concentração de 0,2 a 15,0 µg/mL, mostrando a proporcionalidade entre a área do pico e a concentração de cada amostra analisada<sup>70</sup>. O cálculo da regressão linear resultou na equação:  $y = 50579x - 347,13$ , com coeficiente linear de 0,9996, que é superior ao valor mínimo recomendado. O valor alto de inclinação da curva (50579) indica que o método apresenta boa sensibilidade<sup>27,109,113</sup>.



**Figura 21:** Representação gráfica da curva analítica do ibuprofeno, na faixa de concentração de 0,2 e 15 µg/mL. Equação da reta:  $y = 51226x + 434,65$ ,  $r^2 = 0,9995$ .

### **6.1.3. LQ e LD**

O limite de quantificação (LQ) foi calculado como sendo 0,021 µg/mL, e o limite de detecção (LD) foi de 0,007 µg/mL. Notavelmente, esses limites foram inferiores ao ponto mais baixo da curva analítica (0,2 µg/mL). Esses valores são desejáveis, pois refletem a sensibilidade do método analítico desenvolvido para quantificar o ibrutinibe em estudos de permeação cutânea. O método demonstra a capacidade de quantificar precisamente o fármaco, mesmo em concentrações baixas de ibrutinibe distribuídas na pele, uma vez que a menor porcentagem de ibrutinibe liberada da formulação que pode ser quantificada corresponde a 0,017% do ibrutinibe incorporado às formulações.

### **6.1.4. Precisão**

A precisão de um método analítico é a avaliação da proximidade entre o resultado obtido em análises repetidas e independentes, a partir de um mesmo método. A precisão foi expressa pela repetibilidade e pela precisão intermediária. A repetibilidade é a avaliação das amostras produzidas sob as mesmas condições e mesmo analista, avaliadas em uma corrida analítica única. Já a precisão intermediária é a proximidade dos dados obtidos através de uma mesma amostra preparada por analistas distintos em dois dias diferentes.

Os resultados foram expressos em função do coeficiente de variação e estão representados na Tabela 7. Os coeficientes de variação nas suas diferentes concentrações foram menores que 5%, limite estabelecido pelos órgãos internacionais de validação<sup>113-115</sup>, mostrando que o método é preciso.

### **6.1.5. Exatidão**

A exatidão do método analítico foi avaliada em termos da recuperação do fármaco nas diferentes matrizes biológicas (estrato córneo e pele remanescente). Os valores de recuperação variaram de 89,49 a 102,67%, dependendo da camada da pele avaliada. Todos os resultados apresentaram desempenho de recuperação adequados para determinação em matrizes biológicas<sup>69,70,114</sup>, e estão representados na Tabela 8.

**Tabela 7:** Precisão do ibrutinibe, mensurada pela repetibilidade e precisão intermediária. CV – coeficiente de variação.

Dia	Analista	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)
1	1	1,00	1,01 ± 0,0	0,06
		7,50	7,79 ± 0,17	2,26
		15,00	15,47 ± 0,20	1,32
	2	1,00	0,96 ± 0,03	1,35
		7,50	7,27 ± 0,17	1,70
		15,00	14,86 ± 0,02	1,5
2	1	1,00	1,03 ± 0,01	2,59
		7,50	7,9 ± 0,12	2,21
		15,00	15,8 ± 0,22	0,12
	2	1,00	1 ± 0,03	3,06
		7,50	6,94 ± 0,10	1,48
		15,00	14,75 ± 0,22	1,53

**Tabela 8:** Valores de recuperação do ibrutinibe do estrato córneo e da pele remanescente por extração etanólica após 24 h em agitação. CV – coeficiente de variação.

Amostra	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
Estrato córneo	1,00	1,03 ± 0,01	1,05	102,67
	7,50	7,49 ± 0,15	2,16	99,91
	15,00	15,34 ± 0,08	0,52	102,27
Pele remanescente	1,00	1,00 ± 0,11	12,12	100,08
	7,50	7,03 ± 0,09	1,34	93,72
	15,00	13,42 ± 0,89	6,64	89,49

Esses resultados comprovam a exatidão do método e, em conjunto com os resultados demonstrados anteriormente, demonstram a habilidade do método analítico em determinar o ibrutinibe no modelo de pele mais utilizado para os experimentos de permeação cutânea, usados no desenvolvimento de formulações dermatológicas.

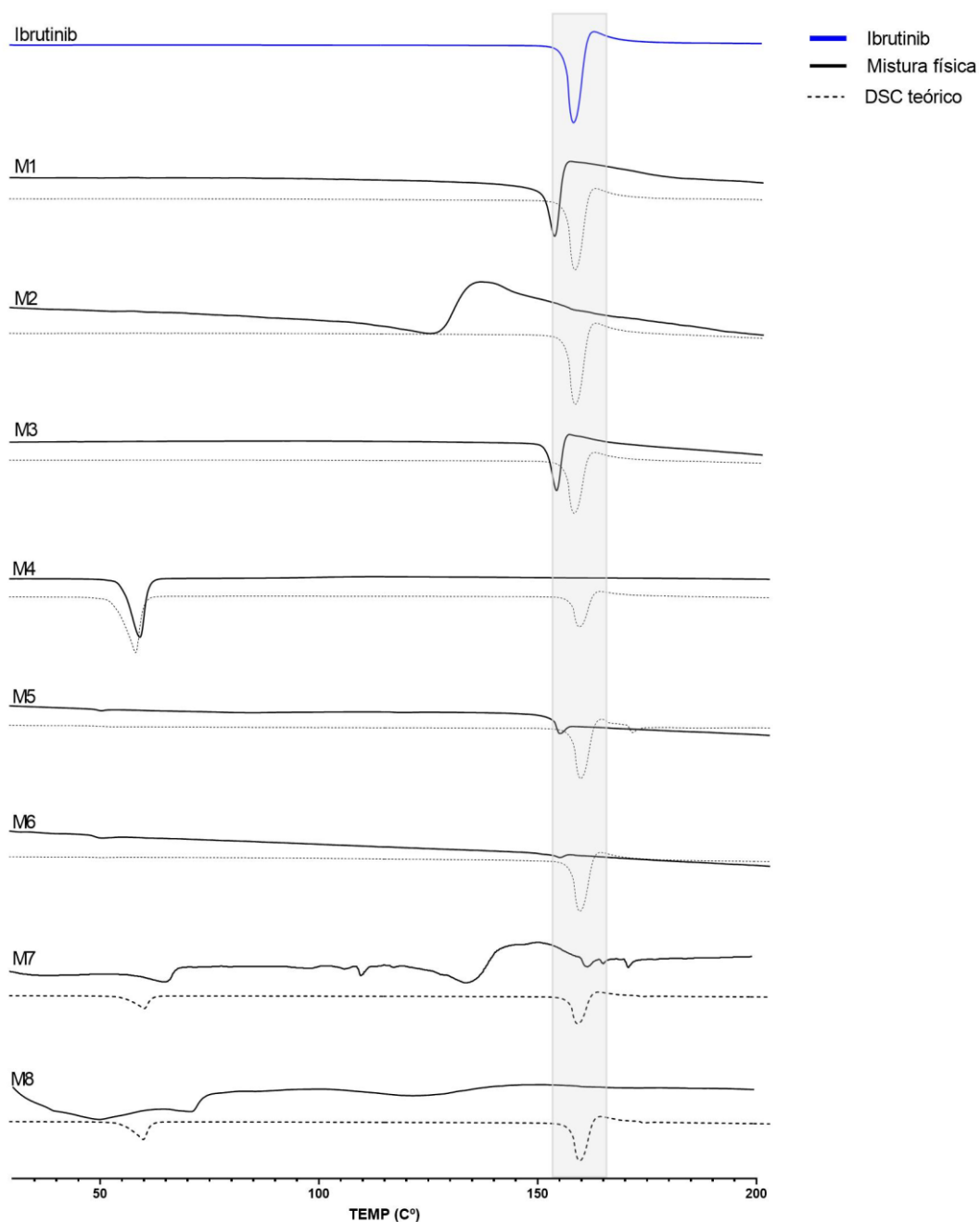
## 6.2. Análise térmica

Com a análise de DSC, é possível observar que na faixa de temperatura em que acontece o processo de produção das CLN, não ocorre nenhum evento térmico significativo de

importância para o ibrutinibe. Os eventos térmicos que ocorreram no fármaco individualmente e nas misturas físicas não interferiram na estabilidade do fármaco. Um evento térmico principal foi observado no ibrutinibe, em torno de 151,41°C, sendo o primeiro endotérmico, indicando um processo de fusão do fármaco<sup>66</sup>.

Ao analisar as misturas físicas de ibrutinibe com os óleos selecionados, foi observado que o óleo mineral apresentou a menor interação com o ibrutinibe, resultando em nenhuma alteração na temperatura de fusão do fármaco, o que indica baixa solubilidade do fármaco nesse óleo. Em contraste, o óleo de semente de romã causou uma redução na transição térmica para 141,7°C. Notavelmente, o ácido oleico demonstrou a maior interação com o ibrutinibe, levando a uma redução do ponto de fusão do fármaco para 105,72°C (Figura 22). Esses achados foram ainda confirmados pelo teste de solubilidade do ibrutinibe nos óleos selecionados, em que o ácido oleico apresentou a capacidade de solubilizar  $130,00 \pm 6,77$  mg/mL de ibrutinibe, enquanto o óleo de semente de romã e o óleo mineral solubilizaram  $2,49 \pm 0,09$  mg/mL e  $0,427 \pm 0,05$  mg/mL de ibrutinibe, respectivamente.

Em relação às misturas físicas de ibrutinibe com os outros excipientes, é importante destacar que o fármaco exibiu dissolução total no ácido esteárico (M4) e parcial nas demais misturas contendo os excipientes da formulação (M5 e M6, Figura 22). Isso pode ser comprovado pela diminuição na entalpia observada no pico de fusão do fármaco, indicando sua dissolução no meio. Curiosamente, os picos térmicos observados no ibrutinibe ainda estão presentes na mistura física M7, que compreende todos os excipientes usados na preparação do primeiro NLC. No entanto, na mistura de excipientes M8, composta pelos excipientes utilizados na preparação do segundo NLC, os picos de fusão e recristalização do fármaco não são observados. Esses resultados sugerem que a mistura física M8 teve uma maior capacidade de solubilizar o ibrutinibe<sup>32,116</sup>. Esses resultados implicam uma interação térmica entre o ibrutinibe e os excipientes, exigindo testes complementares adicionais para elucidar o impacto dessas interações.

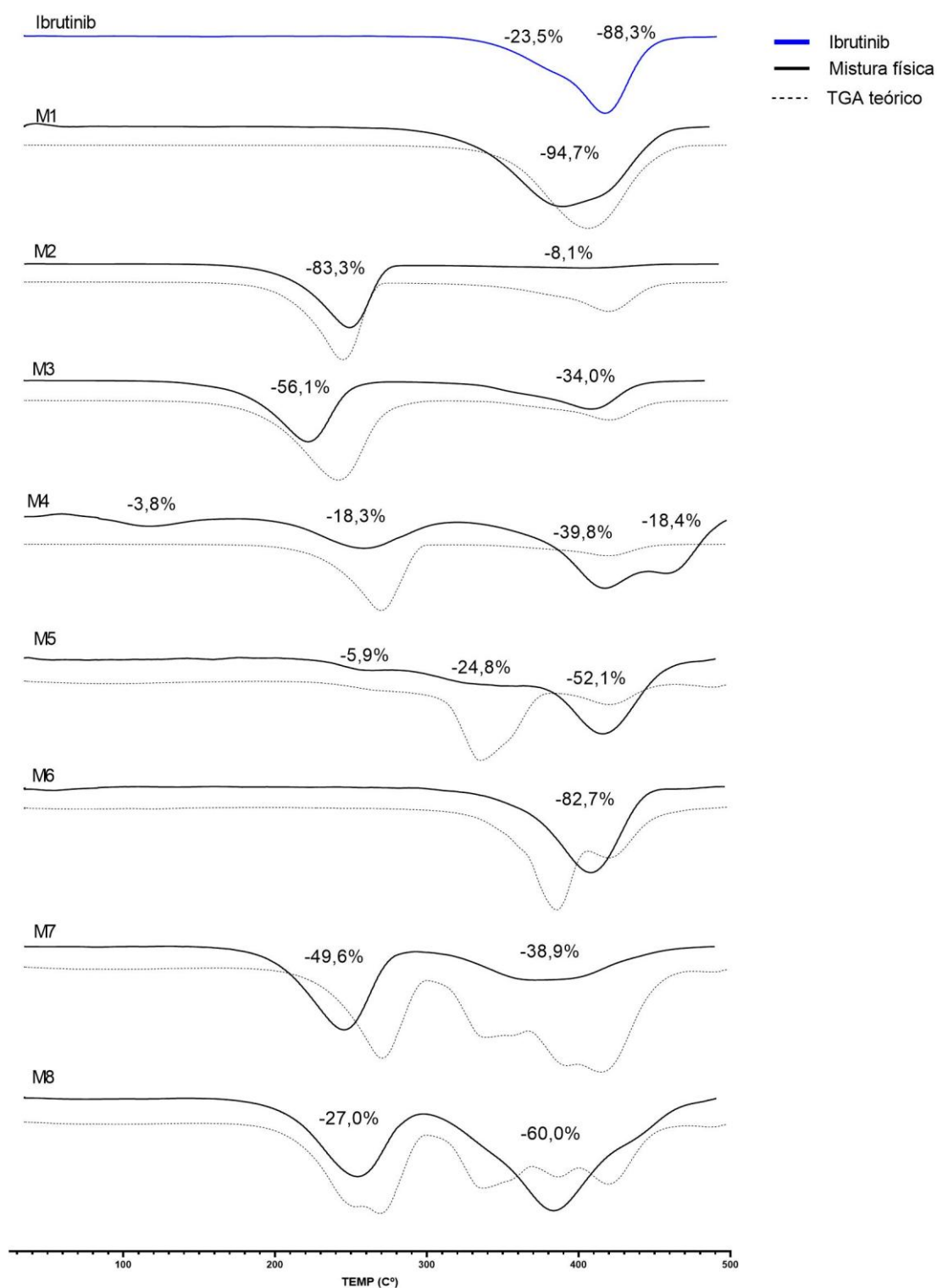


**Figura 22:** Análise DSC do ibrutinibe, excipientes e das suas respectivas misturas físicas. O pico de fusão e do ibrutinibe está destacado com sombreado cinza. A análise compreende o DSC do ibrutinibe e das misturas físicas do ibrutinibe com os excipientes (linha contínua), comparado com o DSC teórico (linha pontilhada), calculado com base no perfil obtido por cada excipiente individualmente.

A análise TGA (Figura 23) mostrou que o ibrutinibe apresenta alta estabilidade térmica, com decomposição a partir de 331,35°C, com uma perda inicial de massa de aproximadamente 23%, seguida de uma perda subsequente de aproximadamente 64%. Nas misturas binárias (M1 a M6), observou-se a manutenção dos perfis teóricos de decomposição com variações mínimas,

sem antecipação do evento inicial de decomposição esperado para as amostras. Esse resultado sugere compatibilidade térmica entre os excipientes avaliados e o ibrutinibe.

Já nas misturas complexas (M7 e M8), enquanto a mistura M8 apresentou um perfil de decomposição semelhante ao teórico, a amostra M7 apresentou uma antecipação dos eventos de decomposição, sugerindo um sinergismo que poderia comprometer a estabilidade da amostra em altas temperaturas. No entanto, considerando que a amostra permaneceu estável até cerca de 200°C, há uma margem de segurança adequada em relação ao processo de obtenção dos CLN, que envolve aquecimento a 80°C.



**Figura 23:** Primeira derivada de TGA do ibuprofeno isolado e das misturas físicas contendo o fármaco e os excipientes selecionados para produção dos nanossistemas. Cada evento de perda de massa está indicado na figura como porcentagem (%) e o TGA obtido por cada mistura física (linhas contínuas) são comparados com o TGA teóricos (linhas pontilhadas), calculados com base no perfil obtido por cada excipiente individualmente.

### 6.3. Obtenção e caracterização dos CLN

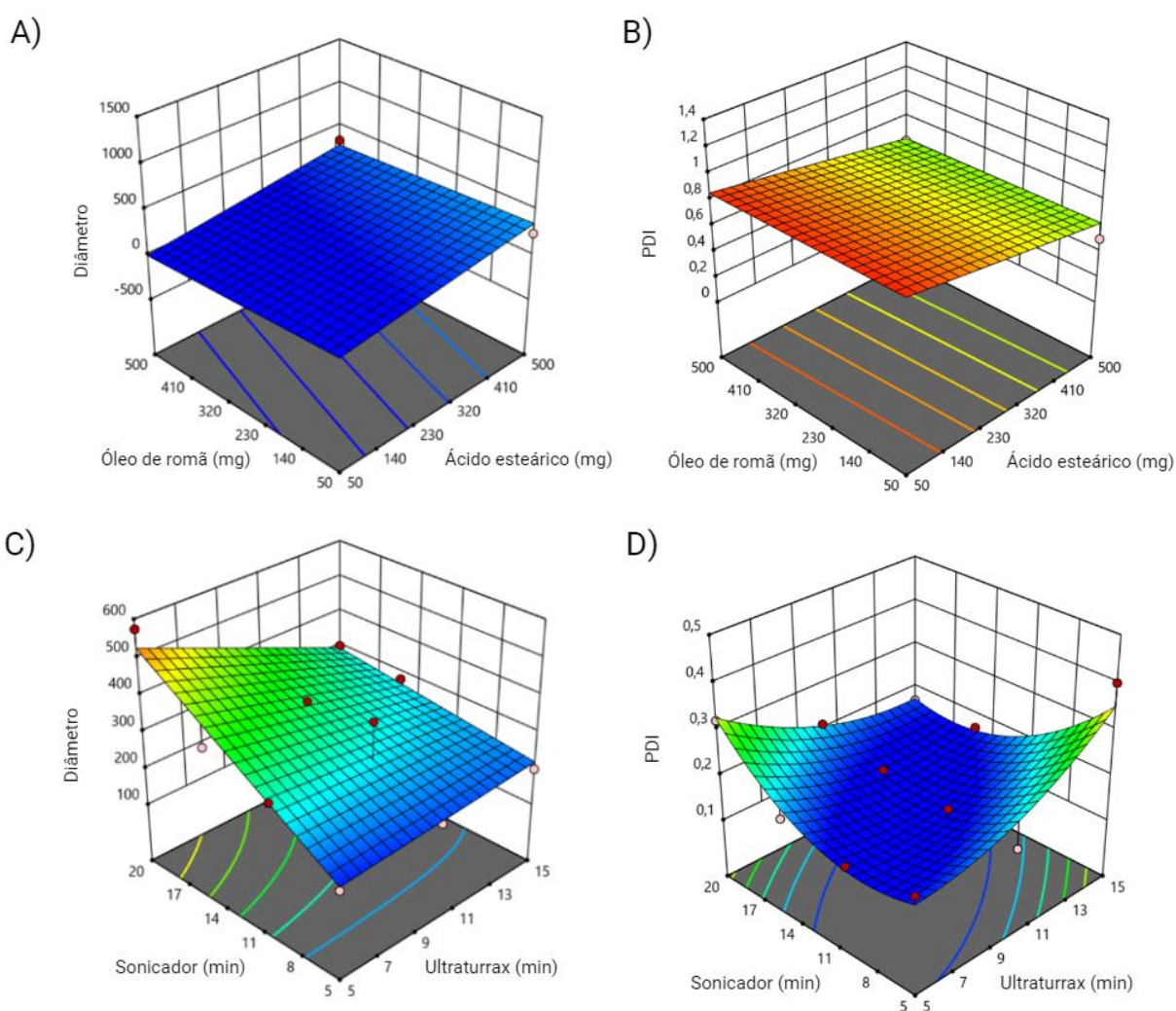
#### 6.3.1. CLN obtido com óleo de semente de romã

Para a obtenção do CLN preparado com óleo de semente de romã (CLN1), foram realizados dois delineamentos experimentais previamente planejados pelo *Software Design-expert* versão 12, que geraram modelos gráficos de superfície de resposta, permitindo observar as mudanças no diâmetro médio e da polidispersividade das partículas em função dos fatores selecionados. Para o primeiro delineamento, os fatores selecionados foram: quantidade de óleo de semente de romã (mg), quantidade de ácido esteárico (mg), de lecitina de soja (mg) e de Tween 80 (mg). Já para o segundo planejamento, os fatores selecionados foram: tempo de agitação em ultra-turrax (min) e tempo de ultrassonicação (min).

Na configuração inicial, conduzimos experimentos com várias combinações, resultando em NLCs com diâmetros médios variando de 177,3 a 1305,7 nm (Figura 24A) e um índice de polidispersividade variando de 0,16 a 0,89 (Figura 24B). Segundo os dados obtidos, as quantidades de lecitina de soja ( $p < 0,0001$ , ANOVA) e polissorbato 80 ( $p = 0,0006$ , ANOVA) na formulação surgiram como os principais fatores que influenciam tanto o diâmetro das partículas quanto no PDI. Observamos que um aumento na quantidade de lecitina de soja levou a uma redução no diâmetro das partículas, enquanto quantidades maiores de polissorbato 80 resultaram em diâmetros de partículas maiores. Além disso, aumentar a quantidade de lecitina de soja aumentou o PDI, enquanto um aumento no teor de polissorbato diminuiu o PDI. Após avaliar várias combinações, selecionamos uma formulação que exibiu um diâmetro médio de partícula reduzido, mantendo uma baixa polidispersividade. Essa formulação específica de NLC consistiu em 500 mg de óleo de semente de romã, 500 mg de ácido esteárico, 500 mg de lecitina de soja e 50 mg de Tween 80, com um volume final de 15 mL. O pH do tampão fosfato foi ajustado para 5,5. A formulação apresentou um diâmetro médio de partícula de  $273,1 \pm 3,0$  nm e um PDI de  $0,50 \pm 0,04$ . Consequentemente, essa composição específica foi escolhida para investigações posteriores.

Com base no nanossistema selecionado, realizamos um segundo experimento para investigar a influência do tempo de agitação usando um ultra-turrax e do tempo de sonicação. Nessa segunda configuração, os NLCs resultantes apresentaram diâmetros médios de partículas variando de 176,3 a 573,9 nm (Figura 24C) e PDI de 0,15 a 0,41 (Figura 24D). Foi observado que o tempo de agitação usando um ultra-turrax apresentou efeito significativo no diâmetro das partículas apenas quando associado a um período prolongado de sonicação ( $p = 0,0237$ , ANOVA). No entanto, um tempo de sonicação mais curto resultou em diâmetros de partículas menores ( $p = 0,0007$ , ANOVA). Em relação ao PDI, tanto o tempo de agitação usando um ultra-

turrax quanto o tempo de sonicação foram observados como fatores que aumentam os valores de PDI ( $p=0,0063$ , ANOVA). Consequentemente, a formulação do NLC selecionada nesta configuração envolveu um tempo de agitação de 5 min usando um ultra-turrax e um tempo de sonicação de 5 min. Essa formulação específica resultou em um diâmetro médio de partícula de  $176,3 \pm 1,0$  nm e um PDI de  $0,18 \pm 0,02$ . Esse nanossistema foi considerado adequado para a incorporação do fármaco ibrutinibe. Após a adição de 1 mg/mL de ibrutinibe, o diâmetro médio das partículas aumentou para  $382,2 \pm 25,3$  nm, enquanto o PDI aumentou para  $0,35 \pm 0,09$ . A eficiência de encapsulação foi de  $91,5 \pm 0,2\%$ .



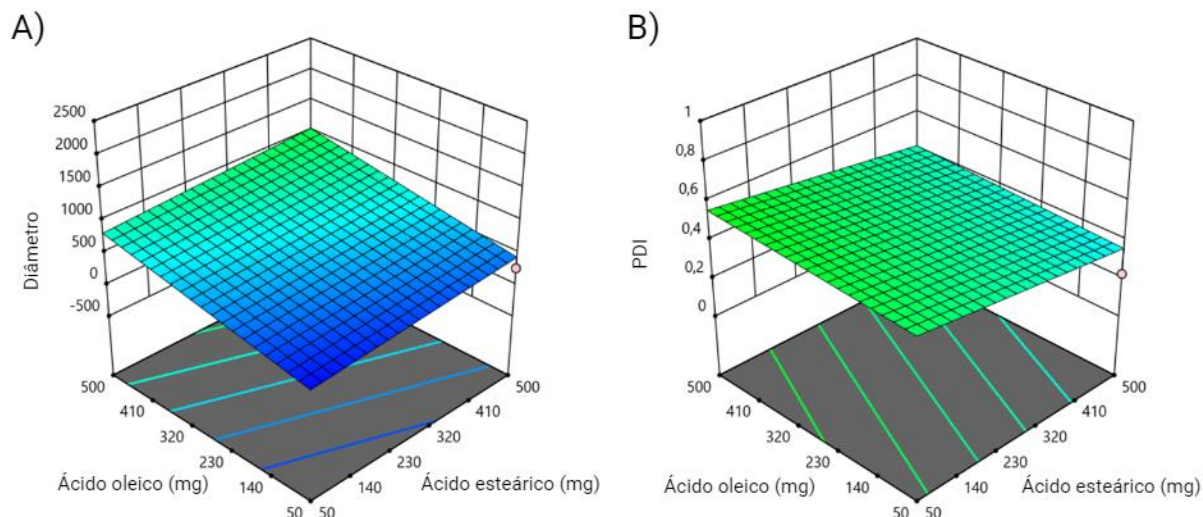
**Figura 24:** Representação da superfície de resposta dos CLN obtidos por diferentes composições e por diferentes métodos de preparo. Dois delineamentos experimentais foram previamente planejados pelo Software Design-Expert versão 12. O primeiro delineamento foi planejado em função da quantidade de cada excipiente na formulação, gerando a superfície de resposta em função do diâmetro médio de partícula em nm (A) e PDI (B). O segundo planejamento foi delineado em função do tempo de agitação em ultra-turrax (min) e tempo de sonicação (min), também gerando superfícies de resposta em função do diâmetro médio de partículas (C) e PDI (D).

### 6.3.2. CLN obtido com ácido oleico

Para obtenção do CLN preparado com ácido oleico (CLN2), também foi realizado um delineamento experimental previamente planejado pelo *Software Design-expert* versão 12, que gerou modelos gráficos de superfície de resposta, permitindo observar as mudanças no diâmetro médio e índice de polidispersividade das nanopartículas em função dos fatores selecionados. Para o delineamento, os fatores selecionados foram: quantidade de ácido oleico (mg), quantidade de ácido esteárico (mg), de lecitina de soja (mg) e de Tween 80 (mg).

Os CLN obtidos apresentaram diâmetros médios de partícula variando de 205,2 a 2945,0 nm, juntamente com um índice de polidispersividade variando de 0,07 a 1,00. Nesse caso, a quantidade de ácido oleico nas formulações destacou-se como o fator que mais influenciou o diâmetro das partículas ( $p=0,0046$ , ANOVA), sendo que, quanto maior a quantidade de ácido oleico, maior o diâmetro médio das partículas (Figura 25A). Por outro lado, em relação ao PDI, maiores quantidades de Tween 80 corresponderam a valores menores de PDI ( $p=0,0126$ , ANOVA; Figura 25B).

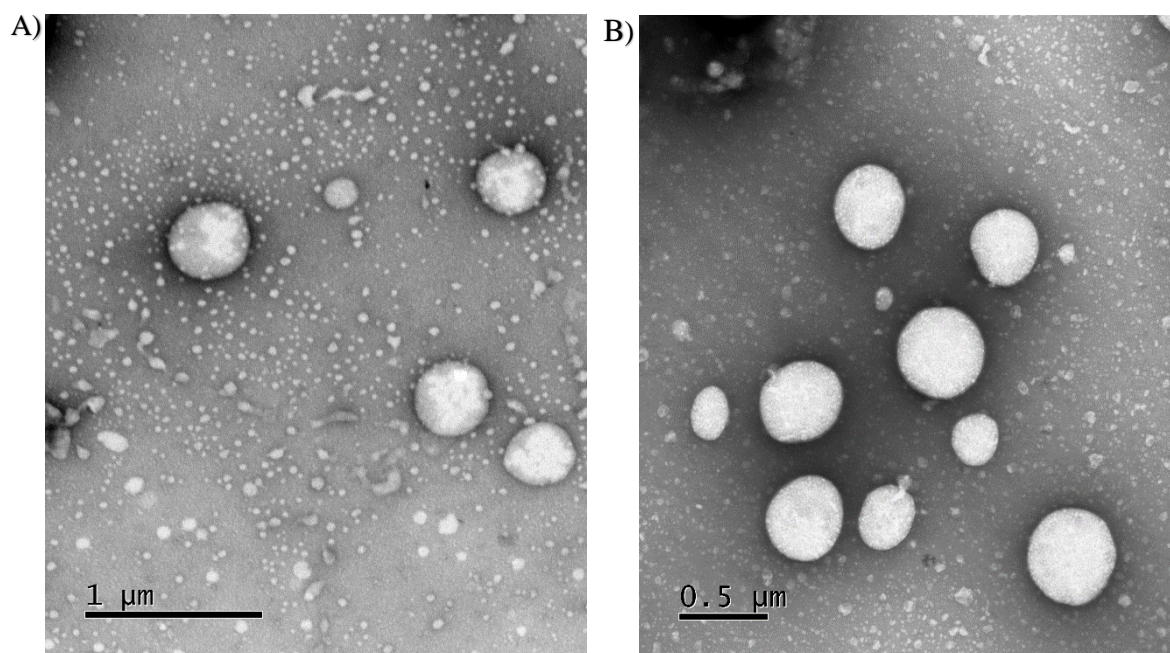
Embora o objetivo deste planejamento experimental fosse identificar o nanossistema com o menor diâmetro de partícula e a menor polidispersividade, a formulação de CLN que demonstrou essas características, consistindo em 500 mg de ácido esteárico, 500 mg de ácido oleico, 50 mg de lecitina de soja e 50 mg de Tween 80, não formou uma suspensão estável e exibiu separação de fases entre as fases aquosa e oleosa. Assim, a formulação selecionada a partir deste planejamento experimental consistiu em 500 mg de ácido esteárico, 50 mg de ácido oleico, 500 mg de lecitina de soja e 500 mg de Tween 80. Essa formulação apresentou um nanopartículas com diâmetro médio de  $271,9 \pm 3,2$  nm e um PDI de  $0,23 \pm 0,04$ . Após a incorporação de 1 mg/mL de ibrutinibe, o diâmetro médio das partículas diminuiu para  $221,0 \pm 2,6$  nm, e o PDI diminuiu para  $0,16 \pm 0,03$ . A eficiência de encapsulação foi de  $96,1 \pm 0,7\%$ .



**Figura 25:** Representação da superfície de resposta dos CLN obtidos por diferentes composições. O delineamento experimental foi previamente planejado pelo Software Design-Expert versão 12, em função da quantidade de cada excipiente na formulação, gerando a superfície de resposta em função do diâmetro médio de partícula em nm (A) e PDI (B).

#### 6.4. Análise morfológica

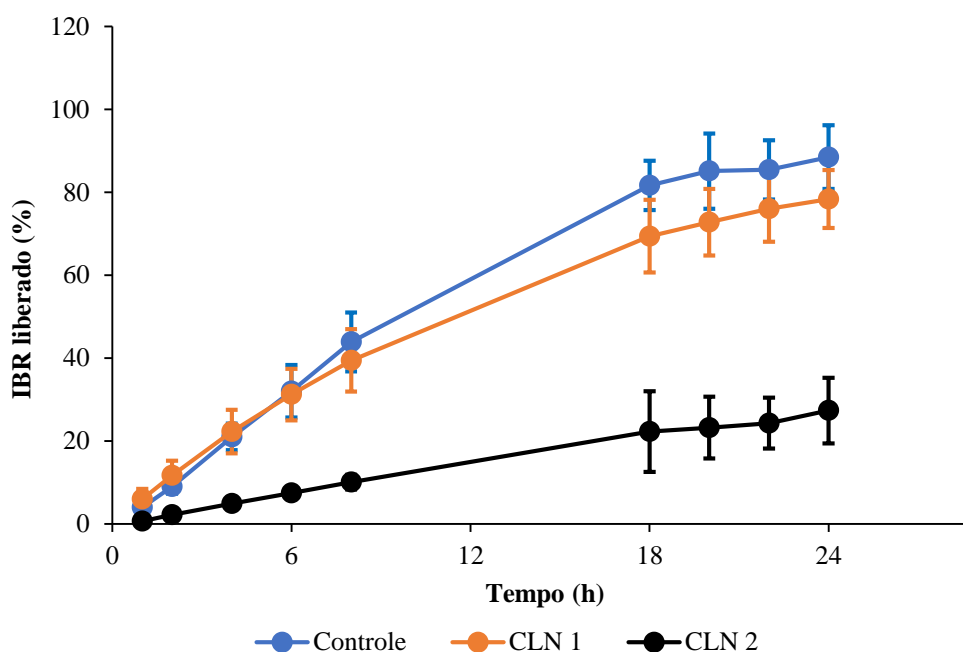
A morfologia de ambos os nanocarreadores lipídicos desenvolvidos foi analisada por Microscopia Eletrônica de Transmissão das amostras (Figura 26). Com as imagens, é possível observar que os carreadores desenvolvidos apresentam formato majoritariamente esférico, o que está de acordo com o descrito na literatura para outros nanocarreadores lipídicos<sup>68,117</sup>. Embora a morfologia apresente algumas diferenças no diâmetro hidrodinâmico observado pela metodologia de espalhamento de luz dinâmica, o processo ao qual as amostras são submetidas, incluindo secagem e coloração, podem ter alterado sutilmente a dimensão de nanocarreadores lipídicos<sup>68</sup>.



**Figura 26:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das formulações contendo (A) CLN1 e (B) CLN2.

### **6.5. Avaliação *in vitro* da liberação do ibrutinibe**

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado com o objetivo de avaliar a velocidade com que o fármaco foi liberado dos nanossistemas. O perfil de liberação do ibrutinibe a partir dos CLN foi comparado ao de um gel de carbopol contendo o ibrutinibe livre na sua formulação, na mesma concentração que nos nanossistemas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 27.



**Figura 27:** Representação gráfica do perfil de liberação do ibrutinibe a partir dos carreadores lipídicos nanoestruturados em comparação ao controle com a mesma concentração de fármaco livre em gel ( $n=5$ ). CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

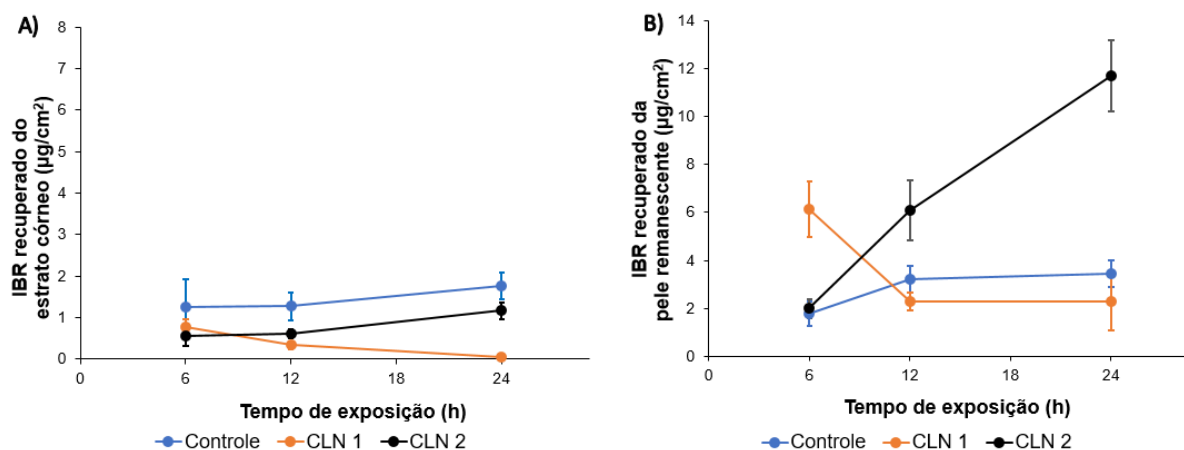
Após 24 h de experimento,  $88,5 \pm 7,7\%$  do ibrutinibe presente no controle atravessou a membrana de celulose e ficou disponível no compartimento receptor. De forma semelhante, o fármaco presente no CLN1 foi liberado na mesma velocidade que o fármaco livre presente no controle, com liberação de  $78,4 \pm 7,0\%$  do ibrutinib em 24 h. Esse perfil de liberação do controle já era esperado, por causa das características lipofílicas do ibrutinibe<sup>32,116</sup>. Entretanto, era esperado que o fármaco permanecesse fortemente ligado ao CLN1, reduzindo a sua velocidade de liberação. É provável que o CLN1 não tenha conseguido controlar efetivamente a liberação de ibrutinibe devido à baixa solubilidade do fármaco no lipídeo líquido, resultando em uma liberação rápida de dentro das partículas<sup>118</sup>, ou ainda que o ibrutinibe tenha permanecido depositado na superfície das nanopartículas devido à sua baixa solubilidade, reduzindo assim sua capacidade de controlar a liberação do fármaco. Esse fenômeno que pode ocorrer mesmo na presença dos demais excipientes, que apresentaram boa capacidade de solubilização, uma vez que, durante o processo de produção do CLN1, a redução da temperatura em banho de gelo diminui a solubilidade do fármaco também no lipídeo sólido e nos tensoativos<sup>119</sup>.

Por outro lado, a liberação do ibrutinibe foi controlada pelo CLN2. Segundo os nossos dados, apenas  $27,3 \pm 7,9\%$  do ibrutinibe presente no CLN2 atravessou a membrana após 24 h de experimento. A liberação do ibrutinibe presente no CLN2 foi estatisticamente menor do que

a liberação do fármaco livre presente no controle a partir das 4 h de experimento (controle:  $21,0 \pm 3,2\%$ ; CLN2:  $4,9 \pm 1,4\%$ ;  $p=0,0011$ , ANOVA), mantendo a liberação controlada até o final do experimento, como esperado devido à interação entre o ibrutinibe e a mistura de lipídios e sua boa solubilidade no lipídeo líquido<sup>32</sup>.

### 6.6. Avaliação *in vitro* da permeação cutânea

O perfil de penetração cutânea do ibrutinibe foi avaliado por 6, 12 e 24 h, com a aplicação dos CLN contendo ibrutinibe sobre a pele suína, comparando com a aplicação do gel contendo ibrutinibe livre. Os resultados obtidos estão representados na Figura 28, em quantidade de ibrutinibe recuperado nas diferentes camadas da pele.



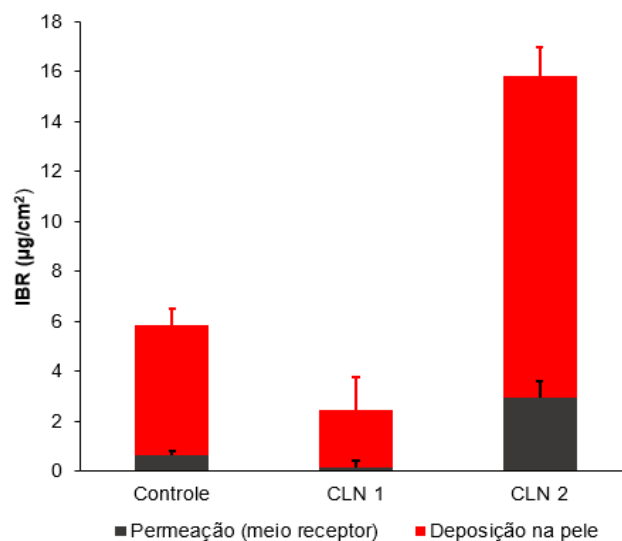
**Figura 28:** Representação gráfica da quantificação do ibrutinibe no estrato córneo (A) e na pele remanescente (B) após ensaio de permeação cutânea por 6, 12 e 24 h. CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

Com relação à quantidade de ibrutinibe retido no estrato córneo, ambos os nanossistemas restringiram a penetração do fármaco nessa camada da pele em relação ao controle a partir de 12 h de exposição à pele ( $p<0,0001$ , ANOVA; controle:  $1,3 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; CLN1:  $0,3 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; CLN2:  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Essa redução é mais evidente quando o tempo de exposição da pele às formulações aumenta. Após 24 h de experimento, ambos os nanossistemas restringiram a penetração do ibrutinibe no estrato córneo ( $p<0,0001$ , ANOVA), quando comparado com o controle (controle:  $1,8 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; CLN1:  $0,03 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; CLN2:  $1,2 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Considerando que o estrato córneo não é o alvo do tratamento do melanoma, idealmente, o fármaco não deve ser retido nessa camada em quantidades elevadas. Um tratamento tópico do melanoma visa, em vez disso, camadas mais profundas da epiderme e da derme superior.

Ao comparar a quantidade de ibrutinibe presente nas camadas mais profundas da pele (pele remanescente), foram observadas diferenças significativas já nas primeiras 6 h de experimento. Nesse momento, o perfil de deposição do ibrutinibe pelo CLN1 excedeu a penetração do fármaco em 3 vezes em comparação ao grupo controle e o CLN2 ( $6,1 \pm 1,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  versus  $1,8 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $2,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente). Considerando que o CLN1 não controlou efetivamente a liberação do ibrutinibe (Figura 27), pode-se supor que as nanopartículas lipídicas desempenharam um papel fundamental na permeabilização do estrato córneo, permitindo rápida difusão do medicamento para as camadas mais profundas da pele logo após a sua aplicação tópica<sup>81,119</sup>.

Entretanto, esse cenário mudou drasticamente quando a pele foi exposta às formulações por 12 e 24 h, com aumento significativo na permeação do ibrutinibe na pele viável do grupo tratado com o CLN2 em comparação com os grupos tratados com CLN1 e controle ( $p=0,0015$ , ANOVA). Enquanto o controle e o CLN1 mantinham uma penetração praticamente constante de 2,3 a 3,4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ibrutinibe na pele remanescente entre 12 e 24 h de exposição às formulações, o CLN liberou respectivamente  $6,1 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $11,7 \pm 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ibrutinibe para a pele viável.

As propriedades dos CLN em potencializar a permeação de fármacos proveniente do seu tamanho reduzido, tensoativos em sua composição e propriedades oclusiva, já são bem conhecidas<sup>118,120</sup>. No entanto, nossas descobertas indicam que, além desses fatores, a interação entre o lipídeo líquido, o fármaco e os lipídeos presentes no estrato córneo são cruciais para que o CLN aprimore efetivamente a penetração cutânea do ibrutinibe. Essas interações são necessárias para aumentar a fluidez dos lipídeos presentes no estrato córneo<sup>120</sup>, o que facilita a deposição do ibrutinibe em concentrações mais altas ao seu tecido alvo, o que é necessário para a sua atividade antitumoral.



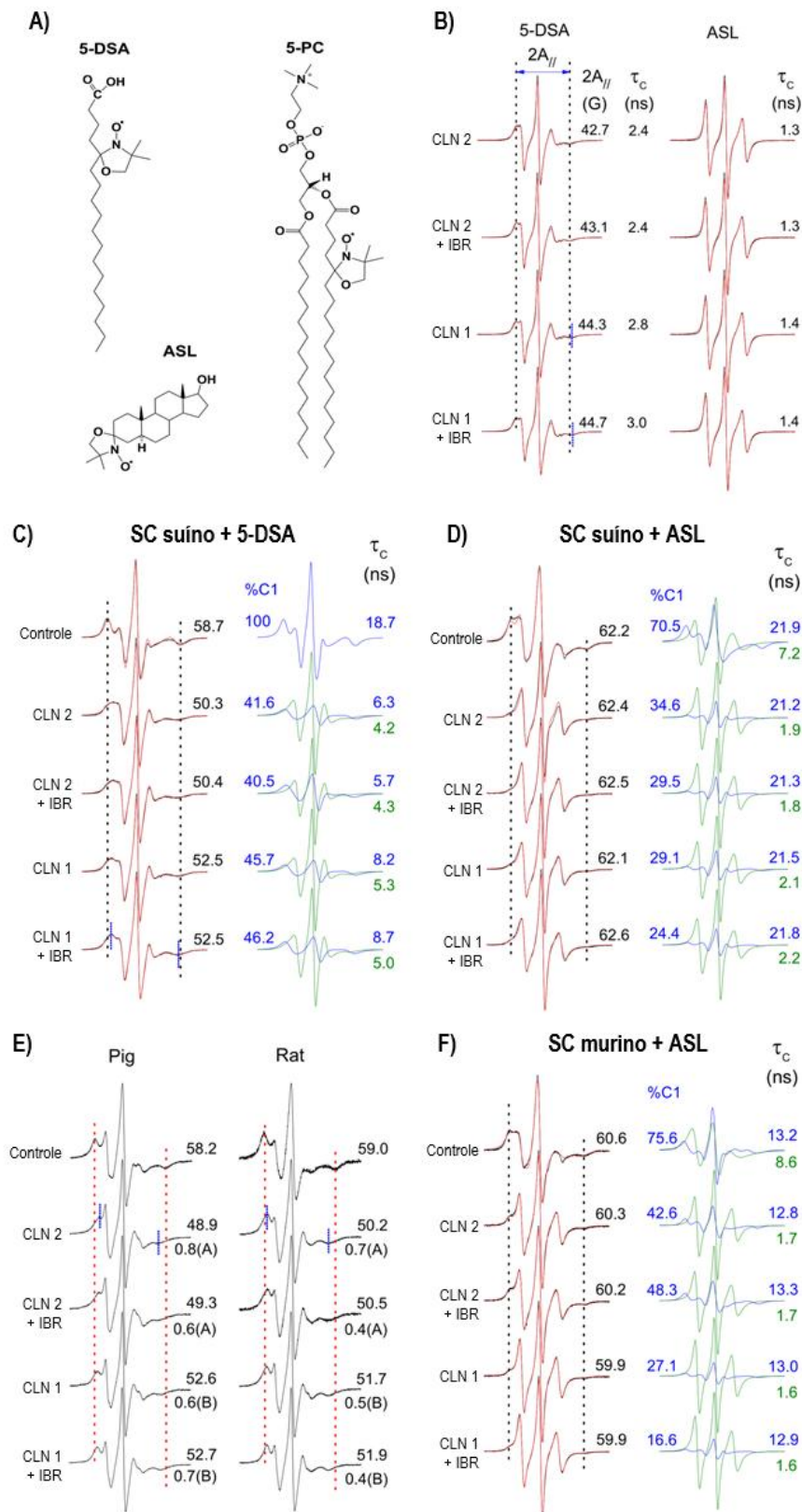
**Figura 29:** Representação gráfica do ibrutinibe depositado na pele em comparação com o ibrutinibe permeado através da pele após 24 h de tratamento com CLN1, CLN2 e formulação controle (n=5).

Após 6 h de ensaio, não foi detectada a presença de ibrutinibe no meio receptor dos grupos CLN1, CLN2 e grupo controle. Esse cenário manteve-se inalterado após 12 h de ensaio para os grupos CLN1 e CLN2. Embora tenha sido detectada uma concentração de  $0,08 \pm 0,18$  µg/mL de ibrutinibe no meio receptor do grupo controle, não houve diferença estatística entre os CLN e o controle ( $p=0,9984$ , ANOVA). Entretanto, ao final de 24 h de permeação, o CLN2 aumentou significativamente a presença de ibrutinibe no meio receptor ( $p<0,0001$ , ANOVA), quando comparado com o controle (controle:  $0,6 \pm 0,2$  µg/mL; CLN2:  $2,9 \pm 0,2$  µg/mL). Por sua vez, o CLN1 manteve a quantidade de ibrutinibe presente no meio receptor próxima à quantidade do controle ( $p=0,2210$ , ANOVA; CLN1:  $0,15 \pm 0,29$  µg/mL).

A Figura 29 representa o depósito acumulado de ibrutinibe na pele total e a permeação do fármaco através da pele após 24 h de tratamento com as formulações controle, CLN1 e CLN2. Os dados evidenciam que a tendência observada em relação ao depósito de ibrutinibe na pele também foi válida em relação à permeação do fármaco através da pele a partir das formulações avaliadas, mas em uma magnitude pelo menos 4 vezes menor. Idealmente, o fármaco deve ser mantido no tecido alvo para um efeito local, permeando o mínimo possível através da pele. No entanto, em um estudo *in vitro*, a permeação do fármaco através da pele não necessariamente reflete em um efeito sistêmico do fármaco, uma vez que o modelo *in vitro* carece de mecanismos de depuração, e não é possível extrapolar os resultados para a dose específica do medicamento permeada após os experimentos *in vitro*. No entanto, os nanossistemas parecem ser mais eficazes em concentrar a liberação do ibrutinibe no tecido-alvo.

### **6.7. Dinâmica molecular dos carreadores lipídicos**

Para analisar como as formulações interagem com o estrato córneo, primeiramente realizou-se uma análise da dinâmica das sondas de spin 5-DSA e ASL nas formulações (Figura 30B). Para a sonda de spin análogo ao ácido esteárico, 5-DSA, o valor do parâmetro  $2A//$ , indicou que a formulação CLN2 era mais fluida que CLN1. Apenas a formulação CLN1 contendo ibrutinibe mostrou uma redução aparente na fluidez. Já para a sonda de spin análogo ao colesterol, ASL, os espectros de RPE indicaram alta dinâmica molecular da sonda, não permitindo a medição de  $2A//$ .



**Figura 30:** Espectros experimentais (linha preta) e de melhor ajuste (linha vermelha) de sondas de spin 5-DSA, ASL e 5-PC mostradas na figura (A), as quais foram inseridas nas membranas intercelulares do estrato córneo de porcos e ratos neonatos sem e com tratamentos usando quatro formulações. (B) 5-DSA e ASL nas formulações. (C) 5-DSA no estrato córneo de porcos para uma amostra não tratada (controle) e amostras após 30 min de tratamento com as formulações. (D) similar ao mostrado no painel c, mas para a sonda de spin ASL. (e) Espectros experimentais representativos da sonda de spin 5-PC para o estrato córneo hidratado de porcos e ratos antes e depois de 2 h de tratamento com as formulações. (F) similar ao mostrado no painel c, mas para a sonda de spin ASL no estrato córneo de ratos.

Quando o estrato córneo de porco hidratado marcado com 5-DSA foi colocado em contato com as formulações por 30 min, foram observadas reduções consideráveis nos valores de  $2A//$  (Figura 30C). As amostras tratadas com CLN2 reduziram o parâmetro em cerca de ~8 G, enquanto aquelas contendo CLN1 reduziram em cerca de ~6 G. A presença do ibrutinibe não causou alterações significativas. Os resultados sugerem que, com o tratamento, apenas ~40% das sondas de spin permaneceram no estrato córneo (linhas azuis) para CLN2 e ~46% para CLN1. Isso indica que houve um aumento na fluidez para as sondas no estrato córneo e uma diminuição na fluidez para as sondas na formulação, devido à troca de lipídios entre o estrato córneo e a nanoformulação.


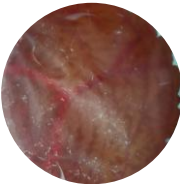
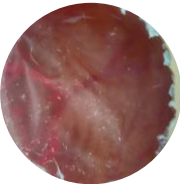
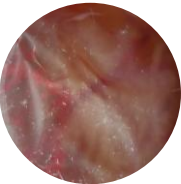
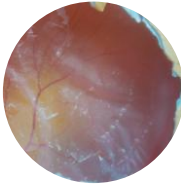
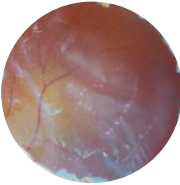
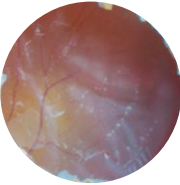
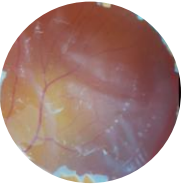
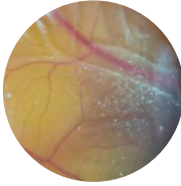
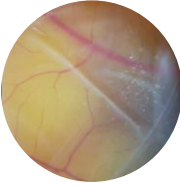






Para examinar mais precisamente a capacidade dos CLN em alterar a dinâmica dos lipídeos do estrato córneo, utilizou-se a sonda de spin 5-PC, que é difícil de ser removida daquela camada. Após 2 h de tratamento com as formulações, esta sonda de spin indicou aumentos significativos na fluidez do estrato córneo de porcos e ratos (Figura 30E). A análise dos dados de  $2A//$  para três experimentos independentes utilizando o estrato córneo de porcos e ratos mostrou que CLN2, com e sem ibrutinibe, foi mais fluidificante do que CLN1. Os experimentos realizados com o estrato córneo de ratos, em vez de porcos, e cujos espectros de RPE estão mostrados na Figura 30F, apresentaram comportamento similar para a sonda ASL, tanto nas amostras tratadas quanto nas não tratadas com as nanoformulações.

Este estudo demonstrou, através da espectroscopia de RPE, que as formulações estudadas interagem fortemente com os domínios lipídicos do estrato córneo, afetando sua dinâmica molecular. Foi observada uma troca entre os lipídios da formulação e o estrato córneo. Como os lipídios do estrato córneo geralmente possuem baixa fluidez e a formulação alta fluidez, após o tratamento do estrato córneo com as formulações, as sondas de spin detectaram um aumento significativo na fluidez do estrato córneo e uma diminuição na formulação. Além disso, as formulações extraíram rapidamente as sondas de spin análogas ao ácido esteárico e ao colesterol incorporadas no estrato córneo, sugerindo que as formulações também podem aumentar a permeabilidade do estrato córneo através da extração de lipídios<sup>95</sup>.

Portanto, esse estudo corroborou o papel dos CLN na permeabilização do estrato córneo, favorecendo a permeação do ibrutinibe para as camadas mais profundas da pele. Além disso, foi demonstrado que o CLN2, no qual o ibrutinibe está bem solubilizado, pode fluidificar melhor o estrato córneo, promovendo a absorção do ibrutinibe, condizendo com os resultados observados nos ensaios de permeação cutânea anteriormente apresentados.

### 6.8. Ensaio *in vitro* em membrana cório-alantoide de ovos de galinhas embrionados (HET-CAM)

O ensaio *in vitro* HET-CAM é uma ferramenta utilizada para avaliar a irritabilidade de formulações por meio da sua aplicação direta na membrana cório-alantoide de ovos fecundados, oferecendo uma alternativa aos testes em animais. Embora não seja particularmente sensível para produtos moderadamente irritantes, o HET-CAM é eficaz na detecção de formulações irritantes severas. Os resultados obtidos estão apresentados na sequência de imagens na Figura 31, com as imagens capturadas nos tempos de 30 s, 2 min e 5 min após a exposição da membrana cório-alantoide às formulações.

	Tempo 0	30 s	2 min	5 min	Índice de irritabilidade
Controle positivo					16,3
Controle negativo					0,0
CLN1					0,0
CLN2					0,0

**Figura 31:** Imagens que demonstram os efeitos observados na membrana cório-alantoide após a aplicação do controle positivo (NaOH 1 mol/L), controle negativo (NaCl 0,9%) e formulações contendo CLN1 e CLN2 após 30 s, 2 min e 5 min de ensaio HET-CAM.

É evidente que o controle positivo, composto por uma solução de NaOH, provocou diversas alterações na membrana, incluindo mudanças na cor e no calibre dos vasos sanguíneos, assim como hiperemia e coagulação nos primeiros 30 s. No entanto, não foi observado hemorragia ao longo dos 5 min subsequentes. Por outro lado, a exposição da membrana à

solução de NaCl 0,9% (controle negativo) não gerou alterações visíveis na membrana durante o período de observação de 5 min. Portanto, o índice de irritabilidade do controle positivo foi calculado em 16,3, indicando irritação severa, enquanto o controle negativo, com um índice de irritabilidade 0, demonstrou não causar irritação.

Assim como o controle negativo, a exposição da membrana cório-alantoide às formulações CLN1 e CLN2 não resultou em alterações nas características da membrana, classificando as duas formulações como não irritantes. Esses dados estão em acordo com os achados na literatura sobre CLN, que geralmente apresentam boa biocompatibilidade e baixa irritabilidade<sup>68,117</sup>. Quanto ao ibrutinibe, a literatura não fornece dados sobre a sua irritabilidade. Portanto, esses dados sugerem que o uso do ibrutinib na concentração de 1 mg/mL, incorporado nos carreadores lipídicos avaliados, é seguro e não causa irritação.

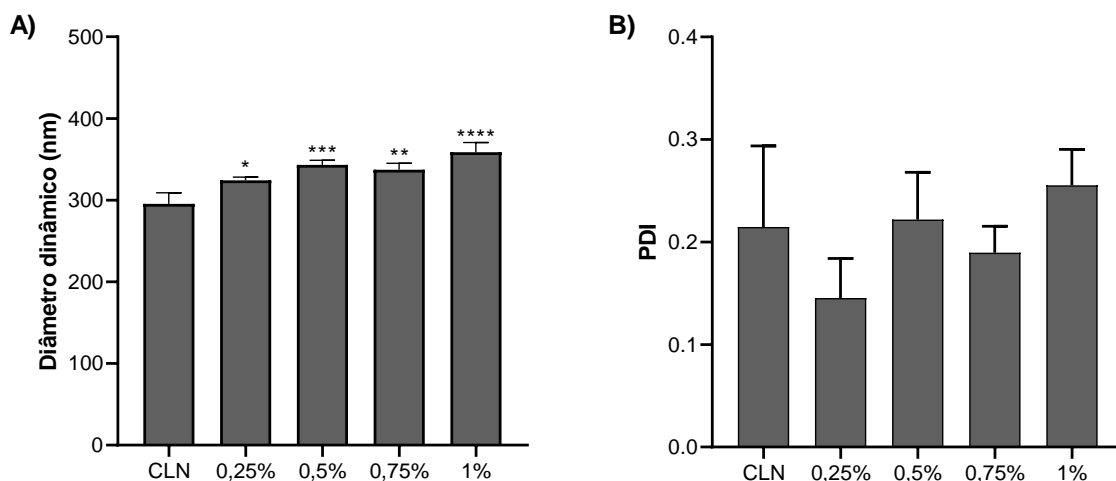
### **6.9. Incorporação do CLN2 em gel fluido**

Embora formulações tópicas à base de CLN apresentem vantagens significativas, como o aumento da permeação cutânea e melhor capacidade de controlar a liberação do fármaco, seu uso isolado apresenta limitações para a aplicação tópica. Uma dessas limitações é a sua baixa viscosidade, que pode dificultar a permanência da formulação na pele pelo tempo necessário para assegurar uma ação terapêutica<sup>121</sup>. Nessas situações, o uso de sistemas tópicos na forma de cremes ou géis torna-se recomendado.

Com base nos resultados obtidos anteriormente, a formulação contendo CLN2 foi selecionada para os experimentos subsequentes. Essa escolha foi fundamentada na sua capacidade de promover a permeação do ibrutinibe, controlar sua liberação de forma prolongada e apresentar baixa irritabilidade cutânea. Nesta etapa, a formulação selecionada foi incorporada em um gel fluido, conferindo as características essenciais para uma formulação tópica, como conforto e facilidade de aplicação<sup>122</sup>. Nesse contexto, os géis fluidos representam uma alternativa promissora, combinando viscoelasticidade, flexibilidade e facilidade de espalhamento adequado<sup>123</sup>.

Para o desenvolvimento do gel fluido, optou-se pelo uso da carboximetilcelulose (CMC) como agente gelificante, devido à sua capacidade de formar géis sem a necessidade de ajustes no pH da formulação<sup>124</sup>. Essa escolha visou evitar possíveis alterações nas características físico-químicas dos CLN, como aquelas associadas ao uso de polímeros como o Carbopol, por exemplo. Para isso, diferentes concentrações de CMC, variando de 0,25% a 1%, foram testadas.

Após a incorporação do CMC, as formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e ao índice de polidispersividade (PDI) dos CLN, e os resultados estão apresentados na Figura 32.

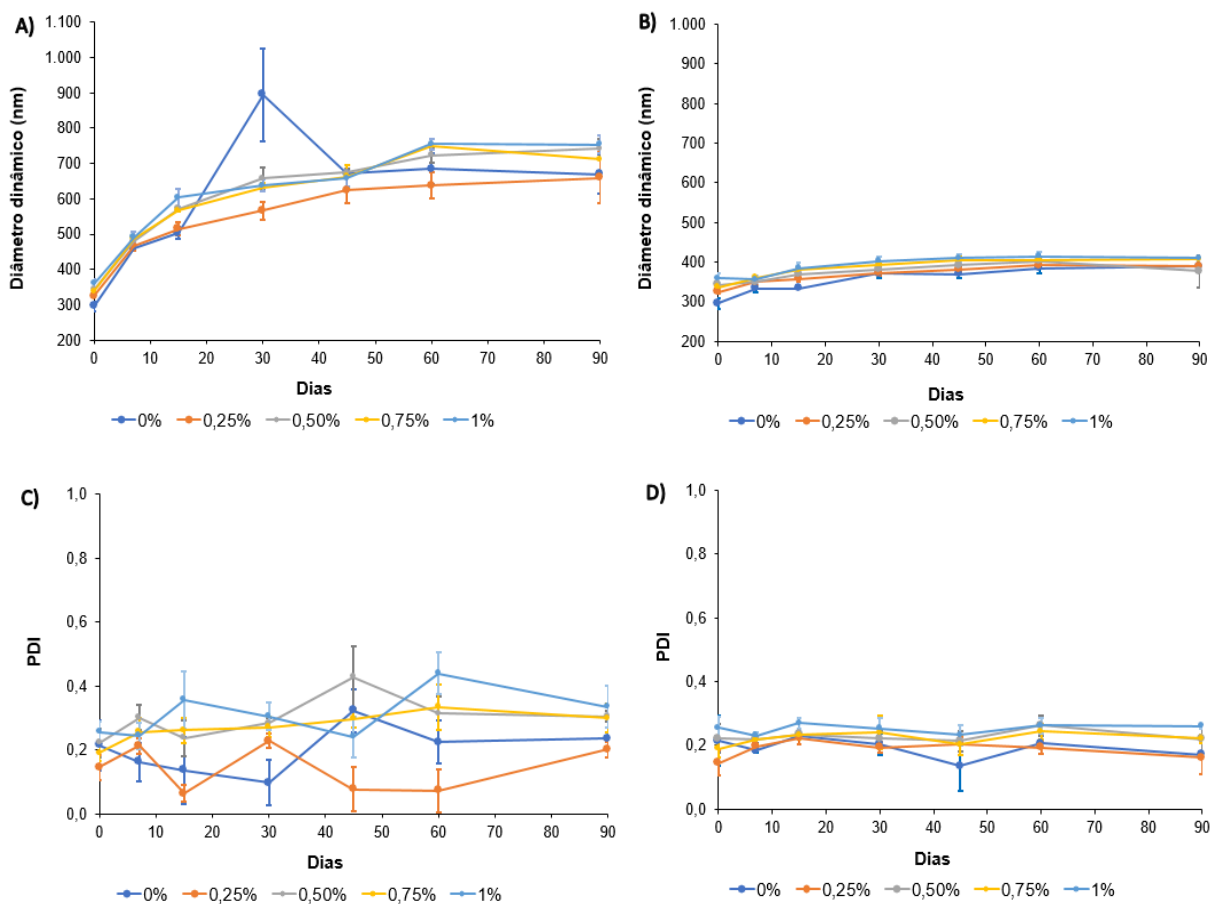


**Figura 32:** Dados da caracterização das formulações contendo CLN2 após a incorporação de diferentes concentrações de CMC (0 a 1%) em função do (A) diâmetro hidrodinâmico médio (nm) e (B) índice de polidispersividade (PDI).

Os resultados obtidos demonstraram uma diferença estatisticamente significativa no diâmetro hidrodinâmico entre a formulação controle (sem CMC) e as formulações contendo diferentes concentrações de CMC ( $p=0,0001$ , ANOVA). A formulação controle apresentou um diâmetro hidrodinâmico dos CLN de  $294,4 \pm 13,6$  nm, enquanto as formulações contendo CMC exibiram valores de tamanho de nanopartículas entre  $324,2 \pm 4,1$  nm e  $358,8 \pm 11,8$  nm, que corresponde a um aumento máximo de 20% em seu diâmetro médio. Por outro lado, não foi observada diferença estatística no índice de polidispersividade (PDI) entre as amostras, mesmo após a incorporação de CMC ( $p=0,1419$ , ANOVA).

### 6.10. Estudo de estabilidade dos géis fluidos

O estudo de estabilidade das formulações contendo CLN2 após a incorporação de CMC foi realizado pela análise da nanoformulação no dia 0 (logo após o preparo das formulações), 7, 15, 30, 45, 60 e 90, em triplicata para cada temperatura selecionada ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ). As alterações no diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade estão representados na Figura 33.



**Figura 33:** Representação do diâmetro hidrodinâmico médio dos CLN2 em formulações contendo diferentes concentrações de CMC quando armazenados em temperatura ambiente (A) e temperatura de geladeira (B), durante 90 dias. Representação dos índices de polidispersividade das mesmas formulações armazenadas em temperatura ambiente (C) ou armazenadas sob refrigeração (D).

Os resultados mostraram que a formulação controle armazenada em temperatura ambiente apresentou aumento significativo no diâmetro hidrodinâmico médio dos CLN já na primeira semana, aumentando de  $295,4 \pm 13,6$  nm para  $460,4 \pm 3,6$  nm ( $p=0,0034$ , ANOVA). Esse aumento continuou até o 45º dia de armazenamento, quando o diâmetro médio estabilizou em  $670,1 \pm 55,3$  nm. De maneira semelhante à formulação controle, as formulações contendo diferentes concentrações de CMC também apresentaram aumento no diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas ao longo do período de armazenamento em temperatura ambiente. Esse comportamento foi consistente entre as formulações, conforme os dados obtidos. A formulação contendo 0,25% de CMC apresentou um aumento significativo no diâmetro médio dos CLN, de  $324,2 \pm 4,1$  nm para  $659,8 \pm 73,3$  nm ( $p<0,0001$ , ANOVA). Para a formulação contendo 0,5% de CMC, o diâmetro médio aumentou de  $343,1 \pm 5,8$  nm para  $742,3 \pm 27,7$  nm ( $p<0,0001$ , ANOVA). A formulação com 0,75% de CMC exibiu um aumento do tamanho dos CLN de  $337,2 \pm 8,0$  nm para  $712,3 \pm 27,7$  nm ( $p<0,0001$ , ANOVA), enquanto a formulação

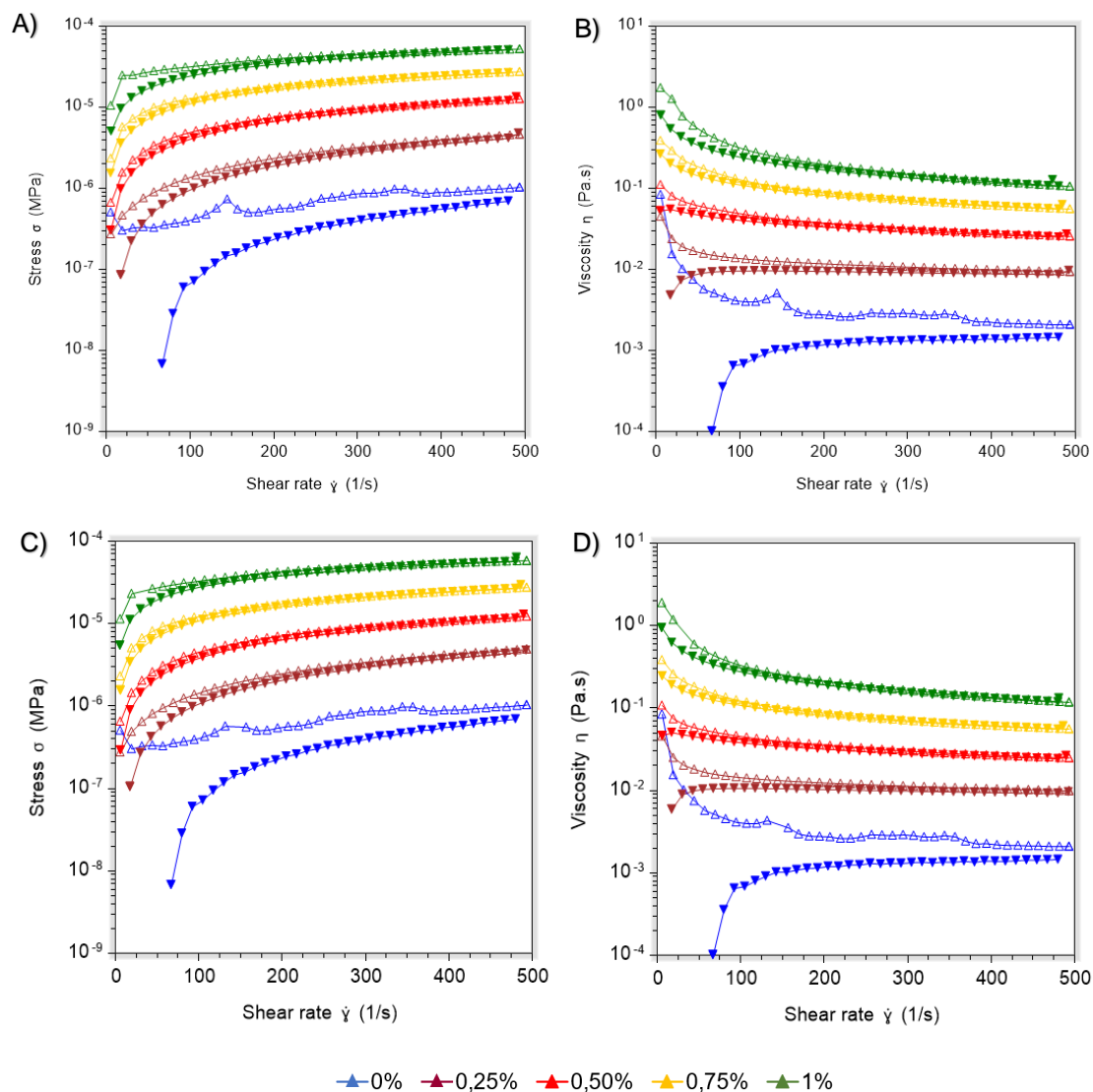
com 1% de CMC apresentou um aumento de  $358,8 \pm 11,8$  nm para  $753,8 \pm 25,1$  nm ( $p < 0,0001$ , ANOVA) entre seus CLN.

As formulações que foram armazenadas em temperatura ambiente também foram as que apresentaram maior variação na polidispersividade das partículas, junto ao aumento no diâmetro hidrodinâmico dos CLN. Isso pode ser explicado pelo fenômeno chamado de amadurecimento de Ostwald, em que partículas com diferença na polidispersividade significativas tendem a ter partículas menores sendo absorvidas pela superfície dos carreadores lipídicos maiores, levando ao aumento do tamanho das partículas, resultando em problemas com a estabilidade<sup>125,126</sup>.

Em contrapartida, a formulação controle armazenada em temperatura de refrigeração apresentou boa estabilidade ao longo do período avaliado, sem alterações estatisticamente significativas no diâmetro hidrodinâmico médio, que foi de  $389,6 \pm 2,2$  nm no final do estudo ( $p = 0,2977$ , ANOVA). Esses resultados indicam que a refrigeração é um fator importante para preservar a estabilidade da formulação. As formulações contendo CMC armazenadas sob refrigeração não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no diâmetro hidrodinâmico médio entre o dia 0 e o dia 90 de análise. Ao final do período, a formulação com 0,25% de CMC apresentou o diâmetro médio de nanopartículas de  $389,0 \pm 7,2$  nm ( $p = 0,2117$ , ANOVA); a formulação contendo 0,5% de CMC atingiu  $376,7 \pm 41,0$  nm ( $p = 0,5654$ , ANOVA); a formulação com 0,75% de CMC apresentou diâmetro médio de CLN de  $406,6 \pm 4,7$  nm ( $p = 0,6061$ , ANOVA); e a formulação com 1% de CMC alcançou  $409,7 \pm 3,76$  nm ( $p = 0,0818$ , ANOVA).

### **6.11. Análise reológica de cisalhamento contínuo dos sistemas de géis fluidos**

Como a espalhabilidade e a viscosidade são fatores essenciais para preparações farmacêuticas de uso tópico, foi realizada a análise reológica das formulações desenvolvidas, com o objetivo de selecionar a mais adequada para os estudos *in vivo*. Essa análise foi conduzida em duas temperaturas: 25°C, representando a temperatura ambiente, e 32°C, simulando a temperatura da superfície da pele. O experimento foi realizado sob gradiente de tensão e de cisalhamento controlado, em modo de fluxo contínuo. As curvas de fluxo e viscosidade dos sistemas estão representadas nas Figura 34.



**Figura 34:** Reogramas das curvas ascendentes e descendentes da tensão de cisalhamento (stress) em função do gradiente de cisalhamento (shear rate) das formulações a 25°C (A) e 32°C (C). Reogramas das curvas ascendentes e descendentes da viscosidade aparente (viscosity) em função do gradiente de cisalhamento das formulações a 25°C (B) e 32°C (D). As curvas ascendentes são representadas pelos símbolos fechados e as curvas descendentes pelos símbolos abertos.

Os resultados indicaram que todas as formulações apresentaram uma relação não-linear entre a tensão e a taxa de cisalhamento, caracterizando-as como líquidos não-Newtonianos. Isso significa que a viscosidade das formulações variou de acordo com a intensidade da força exercida sobre elas<sup>123,127</sup>. Além disso, observou-se que as viscosidades das formulações reduziram à medida que a taxa de cisalhamento aumentava, um comportamento característico de fluidos tixotrópico. Esse comportamento é benéfico para formulações tópicas, pois facilita a aplicação do produto sobre a pele ao reduzir a viscosidade sob tensão, retornando a um estado mais viscoso em repouso, evitando o escorrimento<sup>123</sup>. Esse efeito ocorre devido à reorganização das redes poliméricas formadas pelo CMC na direção do cisalhamento<sup>128</sup>.

Os valores de viscosidade das formulações foram determinados tanto na curva ascendente, quando a força de cisalhamento aumenta, quanto na curva descendente, quando a força de cisalhamento diminui. Os resultados estão representados na Tabela 9.

**Tabela 9:** Resultados de viscosidade das formulações a base de CLN2 contendo carboximetilcelulose nas concentrações de 0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%, nas temperaturas de 25°C e 32°C, durante as curvas ascendente e descendente.

Formulação	Viscosidade (Pa • s)			
	25°C		32°C	
	Curva ascendente	Curva descendente	Curva ascendente	Curva descendente
CLN2	0,1141	$1,8427 \times 10^{-5}$	0,0342	$1,4470 \times 10^{-5}$
CLN2-gel 0,25%	0,0572	$6,3305 \times 10^{-3}$	0,0591	$8,6271 \times 10^{-3}$
CLN2-gel 0,5%	0,2385	0,1034	0,2120	0,0903
CLN2-gel 0,75%	1,1676	0,6103	1,0176	0,5657
CLN2-gel 1%	7,7947	2,2251	7,0407	2,5912

A formulação controle apresentou baixa viscosidade, confirmando a sua fluidez e pouca resistência ao espalhamento, características indesejadas para formulações tópicas. Com a incorporação da CMC, houve um aumento progressivo da viscosidade conforme a concentração de CMC aumentava. Em todas as formulações contendo CMC, a viscosidade da curva descendente foi menor que a curva ascendente, evidenciando o comportamento tixotrópico das formulações. Isso significa que a viscosidade diminui após a aplicação de força e leva um tempo para retornar ao estado original. Esse comportamento é explicado pela quebra e recomposição das interações moleculares dentro do sistema, especialmente em interações fracas, como as forças de Van de Waals<sup>91</sup>.

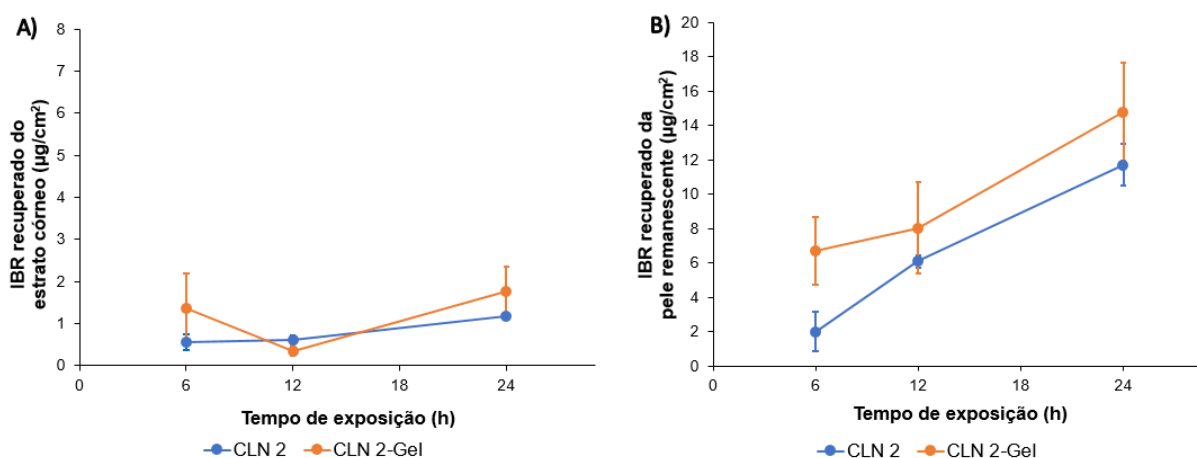
Entretanto, observou-se que as formulações não retornaram completamente ao seu estado inicial após a interrupção do cisalhamento, o que resulta em diferença entre curva ascendente e descendente. Esse comportamento foi mais evidente na formulação controle e nas formulações contendo 0,25% e 0,5% de CMC. Por outro lado, as formulações contendo 0,75% e 1% de CMC apresentaram uma boa recuperação ao seu estado inicial, indicando que são sistemas com boa espalhabilidade e baixo escoamento, o que resulta em boa adesão cutânea<sup>91,123,129</sup>.

A temperatura influenciou diretamente a viscosidade das formulações, reduzindo a resistência ao fluxo. Entretanto, essa redução foi mais acentuada nas formulações com menores concentrações de CMC (0,25% e 0,5%), sugerindo que essas formulações poderiam se tornar excessivamente fluidas na pele. Em contrapartida, as formulações contendo 0,75% e 1% de CMC mantiveram a viscosidade mais elevada, mesmo a 32°C, demonstrando melhor adequação para a aplicação tópica. Entretanto, a formulação contendo 1% de CMC apresentou viscosidade excessivamente elevada, o que pode dificultar a sua aplicação na pele.

Com base nesses resultados, a formulação contendo 0,75% de CMC (denominada CLN2-gel) foi selecionada para dar prosseguimento aos estudos, pois apresentou um bom equilíbrio entre boa espalhabilidade, boa adesão e estabilidade reológica.

### 6.12. Estudo *in vitro* de permeação cutânea de gel fluido contendo CLN2, com e sem massagem

O perfil de permeação *in vitro* da formulação CLN2-gel foi avaliado nos tempos de 6, 12 e 24 h, utilizando a formulação contendo CLN2 como controle. Nesta etapa do estudo, também foram realizados testes com massagem das formulações sobre a pele na tentativa de estimular a permeação cutânea do ibrutinibe, e os resultados obtidos estão representados nas Figuras 35 a 40, em quantidade de ibrutinibe recuperado nas diferentes camadas da pele.



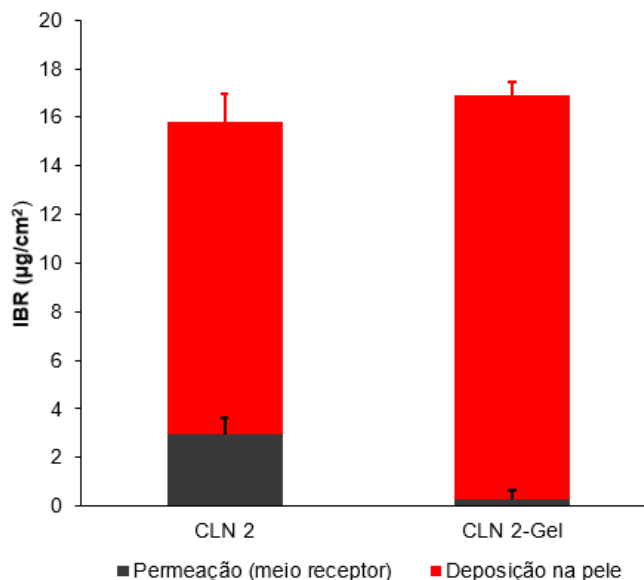
**Figura 35:** Representação gráfica da quantificação do ibrutinibe no estrato córneo (A) e na pele remanescente (B) após exposição da pele às formulações contendo CLN2 ou CLN2-gel por 6, 12 e 24 h. CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

Em relação à quantidade de ibrutinibe retido no estrato córneo durante a permeação sem a aplicação de massagem, ambos os nanossistemas restringiram a penetração do ibrutinibe nessa

camada da pele para os períodos de 6 h ( $p=0,0631$ , ANOVA), 12 h ( $p=0,9331$ , ANOVA) e 24 h ( $p=0,3513$ , ANOVA). Enquanto a formulação CLN2 apresentou a penetração de  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para as 6 h de permeação,  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para 12 h e  $1,1 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ibrutinibe para 24 h, a formulação contendo CLN2-gel apresentou penetração de  $1,3 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para 6 h,  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para 12 h e  $1,7 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para 24 h.

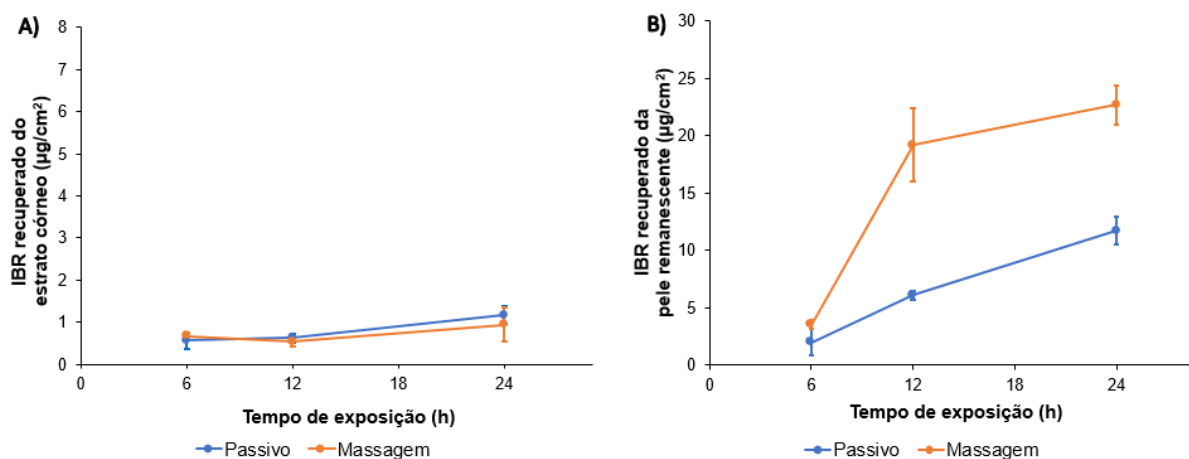
Ao comparar a pele remanescente, que corresponde ao alvo terapêutico, foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos apenas nas primeiras 6 h de experimento. Nesse caso, o perfil de deposição do ibrutinibe pelo CLN2-gel excedeu a penetração do fármaco em 3 vezes em comparação ao grupo CLN2 ( $6,7 \pm 1,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  *versus*  $2,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente;  $p=0,0044$ , ANOVA). Entretanto, quando a pele foi exposta às formulações CLN2-gel e CLN2 por 12 e 24 h, não houve diferença entre os grupos tratadas com ambas as formulações em termos de penetração de ibrutinib (CLN2:  $6,0 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  em 12 h e  $11,7 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  em 24 h; CLN2-gel:  $8,0 \pm 2,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  às 12 h e  $14,8 \pm 2,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  às 24 h).

Esses resultados podem ser explicados pelas características físicas do hidrogel selecionado para os experimentos. Embora a presença de CMC aumente a viscosidade da formulação, optou-se por uma concentração que não resultasse em viscosidade excessiva à formulação, como o observado na formulação contendo 1% de CMC. Além disso, o estudo de permeação cutânea foi realizado à  $32^\circ\text{C}$ , o que reduz a viscosidade da formulação, favorecendo a formação de uma rede polimérica mais frouxa. Esse efeito pode facilitar a difusão das nanopartículas lipídicas para fora do hidrogel<sup>124</sup>, explicando a maior deposição inicial do ibrutinibe com CLN2-gel, mas sem alteração significativa após períodos mais longos. Portanto, apesar da formulação selecionada apresentar uma viscosidade que favorecesse a adesão da formulação à pele, essa viscosidade não impediu a difusão das nanopartículas lipídicas pelo hidrogel.



**Figura 36:** Representação gráfica do ibrutinibe depositado na pele em comparação com o ibrutinibe permeado através da pele após 24 h de tratamento com CLN2 e CLN2-gel (n=5).

Não foi detectado ibrutinibe no meio receptor do grupo CLN2 após 6 h de experimento. Embora tenha sido detectado uma concentração de  $0,3 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ibrutinibe após 6 h de experimento no grupo CLN2-gel, não houve diferença estatística entre os dois grupos ( $p=0,7514$ , ANOVA). Esse cenário se repetiu após 12 h de experimento ( $p<0,9999$ , ANOVA). Entretanto, ao final das 24h de permeação, o grupo CLN2 aumentou significativamente a presença de ibrutinibe no meio receptor ( $p<0,0001$ , ANOVA) quando comparado com o grupo CLN2-gel (CLN2:  $2,9 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; CLN2-gel:  $0,3 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).



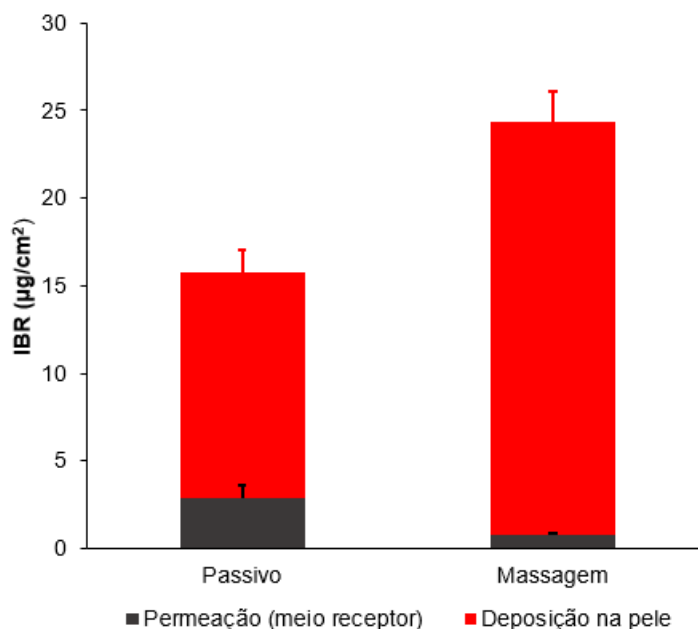
**Figura 37:** Representação gráfica da quantificação do ibrutinibe no estrato córneo (A) e na pele remanescente (B) após exposição da pele às formulações contendo CLN2 por 6, 12 e 24 h, com ou sem a aplicação de massagem no início do experimento. CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

No perfil de permeação do ibrutinib com massagem, comparando apenas formulações contendo CLN2, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de fármaco retido no estrato córneo entre os ensaios com e sem massagem ao longo das 24 h de experimento. No experimento sem massagem, a quantidade de ibrutinibe retido no estrato córneo foi de  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 6 h,  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 12 h e  $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ibrutinibe após 24 h de exposição da pele à formulação contendo CLN2. Com a aplicação de massagem, os valores foram de  $0,7 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ibrutinibe após 6 h ( $p=0,9619$ , ANOVA),  $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 12 h ( $p=0,9901$ , ANOVA) e  $0,9 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 24 h ( $p=0,7030$ , ANOVA), sem diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo sem o massageamento.

Em contrapartida, ao compararmos a quantidade de ibrutinibe recuperada na pele remanescente, observamos que a aplicação de massagem aumentou a quantidade de fármaco nessa camada da pele após 12 h de experimento. Durante as primeiras 6 h de experimento, apesar da quantidade de ibrutinibe na pele remanescente ter aumentado de  $2,0 \pm 1,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para  $3,5 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de ibrutinibe, esse aumento não foi estatisticamente significativo ( $p=0,6564$ , ANOVA). No entanto, após 12 h, a aplicação de massagem aumentou a quantidade de ibrutinibe em 3,2 vezes em relação à condição sem massagem (sem massagem:  $6,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; com massagem:  $19,2 \pm 3,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $p<0,0001$ , ANOVA). De forma semelhante, após 24 h, a massagem aumentou a quantidade de ibrutinibe na pele remanescente em 1,9 vezes (sem massagem:  $11,7 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; com massagem:  $22,7 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $p<0,0001$ , ANOVA).

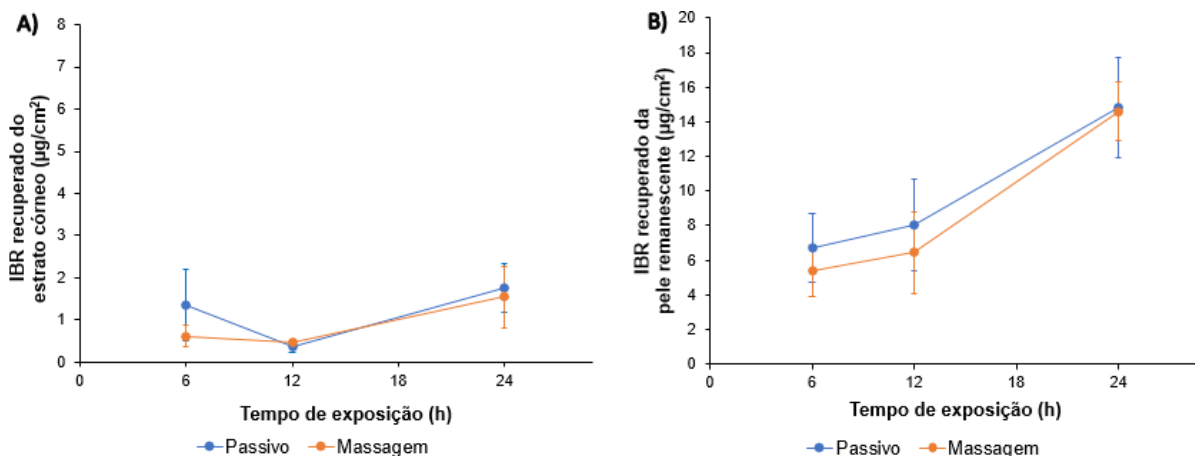
É de amplo conhecimento que a aplicação de massagem sobre a pele é um método mecânico utilizado para induzir a permeação cutânea. Esse efeito é atribuído ao melhor espalhamento da formulação sobre a pele, à reorganização da matriz lipídica da pele, o que favorece a interação entre os lipídeos da pele e os lipídeos presentes nos CLN, ou ainda a redução da resistência cutânea. Fricções suaves e de curta duração podem não ter impacto significativo na permeação cutânea<sup>130</sup>. A literatura sugere que diferentes métodos de fricção podem melhorar a permeação cutânea, independentemente do tipo de fricção utilizado. Entretanto, o fator crucial é a aplicação de uma força adequada por um tempo adequado de fricção<sup>130,131</sup>. Quando a massagem possui intensidade e duração suficientes, pode reduzir a resistência cutânea, facilitando a absorção de fármacos pela pele<sup>131</sup>. Como demonstrado anteriormente, nossos dados indicam que a interação entre os lipídeos da pele e os lipídeos presentes na formulação é essencial para que o CLN efetivamente melhore a permeação cutânea do ibrutinibe. Esses achados corroboram os resultados anteriores, sugerindo que a fricção da

formulação com a pele pode aumentar a fluidez dos lipídeos presentes no estrato córneo, um fator necessário para a permeação cutânea do ibrutinibe.



**Figura 38:** Representação gráfica do ibrutinibe depositado na pele em comparação com o ibrutinibe permeado através da pele após 24 h de tratamento com CLN2, com ou sem aplicação de massagem no início do experimento (n=5).

Não foi detectado ibrutinibe no meio receptor no grupo sem massagem nas primeiras 12 h de experimento. Embora uma pequena quantidade de ibrutinibe tenha sido detectada no meio receptor nas primeiras 6 h após a aplicação de massagem ( $0,7 \pm 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), não houve diferença estatística entre os grupos analisados ( $p=0,5539$ , ANOVA). O mesmo ocorreu após as 12 h de experimento, em que não foi detectado ibrutinibe em ambos os grupos ( $p>0,9999$ , ANOVA). Entretanto, após 24 h de ensaio, observou-se um aumento de 3,8 vezes na quantidade de ibrutinibe no meio receptor no grupo sem massagem, com uma concentração de  $2,9 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , em comparação com  $0,7 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  no grupo com massagem ( $p=0,0003$ , ANOVA). Esses resultados, em conjunto, sugerem que a aplicação de massagem sobre a formulação contendo CLN2 favoreceu uma maior deposição de ibrutinibe na pele remanescente, que é o alvo terapêutico, sem necessariamente aumentar a quantidade de fármaco que atravessa a pele ou que fica retida no estrato córneo.



**Figura 39:** Representação gráfica da quantificação do ibrutinibe no estrato córneo (A) e na pele remanescente (B) após exposição da pele às formulações contendo CLN2-gel por 6, 12 e 24 h, com ou sem a aplicação de massagem no início do experimento. CLN – carreador lipídico nanoestruturado.

Essa mesma comparação foi realizada no grupo tratado com a formulação contendo CLN2-gel, a fim de avaliar o impacto da massagem no perfil de penetração do ibrutinibe. Os resultados indicam que a aplicação de massagem não levou a diferenças estatisticamente significativas na quantidade de ibrutinibe recuperado tanto no estrato córneo quanto na pele remanescente ao longo do experimento.

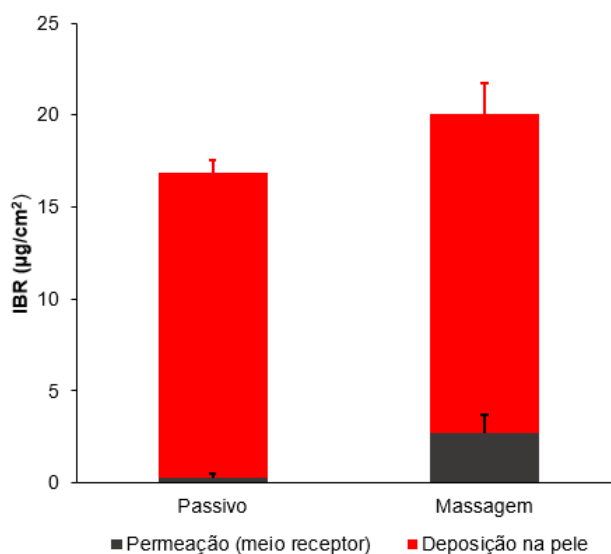
No estrato córneo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com e sem massagem após 6 h ( $p=0,1819$ , ANOVA), 12 h ( $p=0,9991$ , ANOVA) e 24 h ( $0,9729$ , ANOVA) de experimento. A quantidade de ibrutinibe recuperado no grupo sem massagem foi de  $1,3 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 6 h,  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 12 h e de  $1,7 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 24 h, enquanto no grupo que recebeu massagem os valores foram de  $0,6 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $1,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente.

De maneira semelhante, a aplicação de massagem também não resultou em diferença na quantidade de ibrutinibe penetrado para a pele remanescente, sem diferença estatística entre os grupos após 6 h ( $p=0,9118$ , ANOVA), 12 h ( $0,8757$ , ANOVA) e 24 h ( $p>0,9999$ , ANOVA). No grupo sem massagem, as quantidades de ibrutinibe recuperados da pele foram de  $6,7 \pm 1,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 6 h,  $8,0 \pm 2,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 12 h e  $14,8 \pm 2,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 24 h. Já no grupo com aplicação de massagem, os valores foram de  $5,4 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $6,5 \pm 2,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  e  $14,6 \pm 1,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente.

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais que se expandem em água. A CMC forma estruturas fisicamente entrecruzadas, mantidas juntas por forças moleculares, como interações iônicas ou ligações de hidrogênio<sup>91,124</sup>. Embora essas características ofereçam

vantagens para a formulação, como encapsulação e proteção dos CLN, a estrutura polimérica pode reduzir a interação dos CLN com o estrato córneo durante a fricção provocada pela massagem. Além disso, a rede polimérica pode ajudar a preservar a integridade física da barreira cutânea, atenuando o efeito promotor de permeação da massagem.

Portanto, os resultados, em conjunto, sugerem que, apesar da permeação passiva ser similar entre as formulações contendo CLN2 e CLN2-gel, a rede polimérica presente na formulação CLN2-gel pode ter restringido a mobilidade dos carreadores lipídicos durante a massagem. Como demonstrado anteriormente, a interação entre os lipídeos da pele e os presentes na formulação é um passo essencial para a permeação cutânea. A presença da rede polimérica em CLN2-gel pode ter limitado essa interação, comprometendo a ação indutora de permeação da massagem.



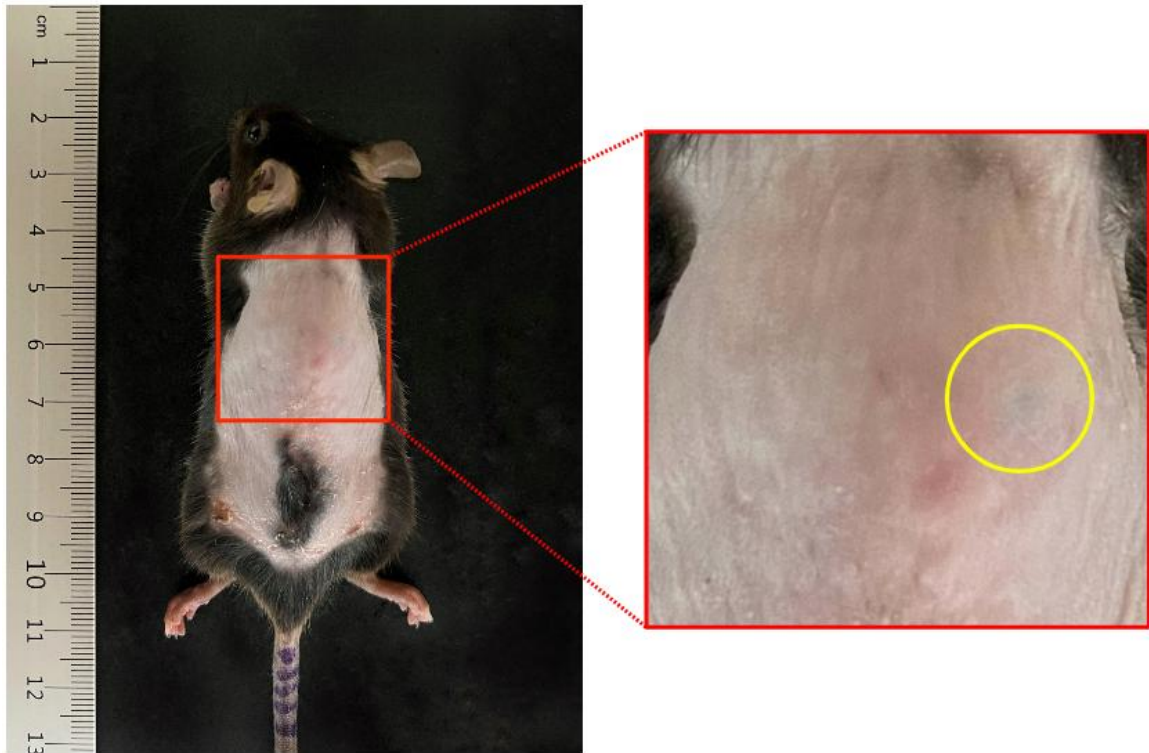
**Figura 40:** Representação gráfica do ibrutinibe depositado na pele em comparação com o ibrutinibe permeado através da pele após 24 h de tratamento com CLN2-gel, com ou sem aplicação de massagem no início do experimento (n=5).

Também não foram observadas diferenças significativas na quantidade de ibrutinibe detectado no meio receptor após 6 h ( $p=0,898$ , ANOVA) e 12 h ( $p>0,9999$ , ANOVA) de experimento. Para o grupo sem massagem, as quantidades de ibrutinibe detectadas no meio receptor foram de  $0,3 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 6 h,  $0,0 \pm 0,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 12 h e  $0,3 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 24 h de experimento. No grupo com massagem, os valores foram de  $0,0 \pm 0,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 6 h,  $0,0 \pm 0,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 12 h e  $2,7 \pm 0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  após 24 h. Esses resultados indicam que, após 24 h, a quantidade de ibrutinibe detectado no meio receptor foi 9 vezes maior no grupo que recebeu a aplicação de massagem, quando comparado com o grupo sem massagem

( $p < 0,0001$ , ANOVA). Portanto, considerando as características reológicas da formulação CLN2-gel e o fato de que a presença do agente gelificante não interferiu na permeação cutânea passiva do ibrutinibe, optou-se por dar continuidade aos estudos *in vivo* utilizando essa formulação como objeto de estudo. No entanto, como a aplicação de massagem não se mostrou eficaz como método de indução de permeação para a formulação estudada, padronizou-se a aplicação tópica nos camundongos sem a realização de massagem vigorosa por 3 minutos, conforme testado nos estudos *in vitro* de permeação cutânea. Em substituição, a aplicação foi realizada com o auxílio de haste estéril com ponta de algodão, realizando movimento circular por 30 segundos, de forma padronizada, com o objetivo de garantir a uniformidade na administração da formulação entre os camundongos.

### **6.13. Avaliação *in vivo* do efeito terapêutico de CLN2-gel em camundongos com melanoma B16-F10**

Para avaliar o efeito terapêutico da aplicação tópica da formulação CLN2-gel, foi realizado um estudo *in vivo* em camundongos C57BL/6 com melanoma. A formulação foi administrada por via tópica diariamente sobre o dorso dos camundongos, local previamente selecionado para o transplante das células B16-F10. A administração das formulações e início dos tratamentos comparativos ocorreram no dia do diagnóstico do melanoma (Figura 41), simulando um cenário em que o tratamento seria iniciado precocemente, ainda nos estágios iniciais da doença.



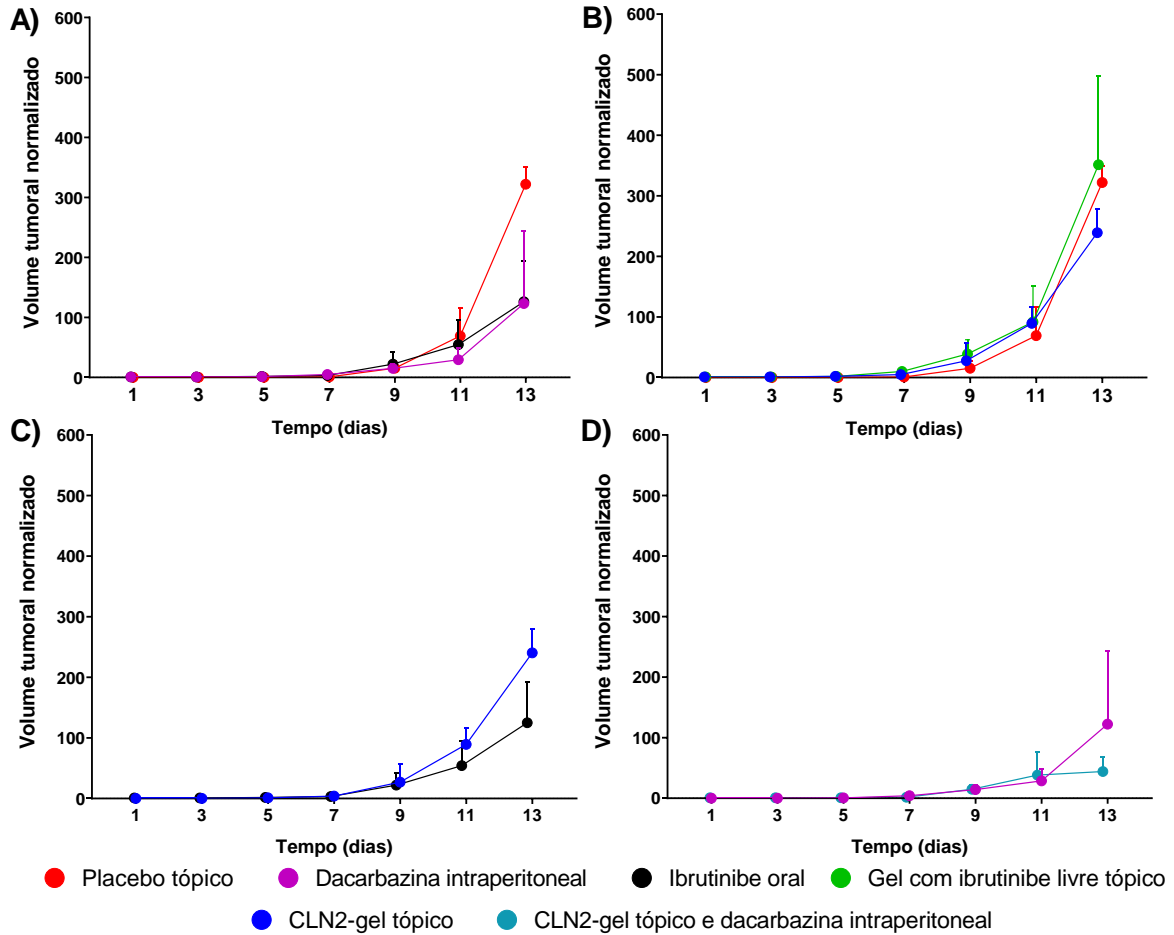
**Figura 41:** Representação do diagnóstico clínico do melanoma B16-F10 em camundongos da linhagem C57BL/6.

A partir do terceiro dia após o transplante celular, todos os camundongos foram submetidos à análise em dias alternados pelo sistema IVIS-Lumina. O tratamento foi iniciado com base no diagnóstico por imagem, realizado pelo IVIS-Lumina, ou no diagnóstico clínico, caracterizado pela presença de um pequeno volume no local transplantado, com ou sem o surgimento de mancha. Os primeiros sinais clínicos foram observados entre os dias 3 e 5 após o transplante celular. No entanto, até a conclusão do experimento, não houve a detecção de sinal de bioluminescência pelo IVIS-Lumina, e a avaliação da evolução dos tumores foi conduzida exclusivamente por meio dos parâmetros clínicos dos camundongos e medições dos tumores em dias alternados.

A ausência de luminescência pode estar relacionada a diversos fatores, incluindo a falta de vascularização tumoral nos estágios iniciais do desenvolvimento do tumor, a presença de áreas necróticas nas fases mais avançadas, além de interferências na leitura, como pelo aparecimento de manchas na pele, hiperpigmentação produzida pelo tumor ou a própria coloração da pelagem dos camundongos<sup>132</sup>.

Os resultados obtidos para o volume tumoral normalizado, calculado com base na medição dos tumores, estão representados na Figura 42, representado em volume tumoral

normalizado calculado ao longo do tempo (dias), e na Figura 43, representado o volume tumoral normalizado de todos os grupos no 13º dia após o transplante celular. Para o ajuste dos valores, cada volume tumoral calculado foi dividido individualmente pelo volume do tumor do respectivo camundongo no dia do diagnóstico do melanoma.

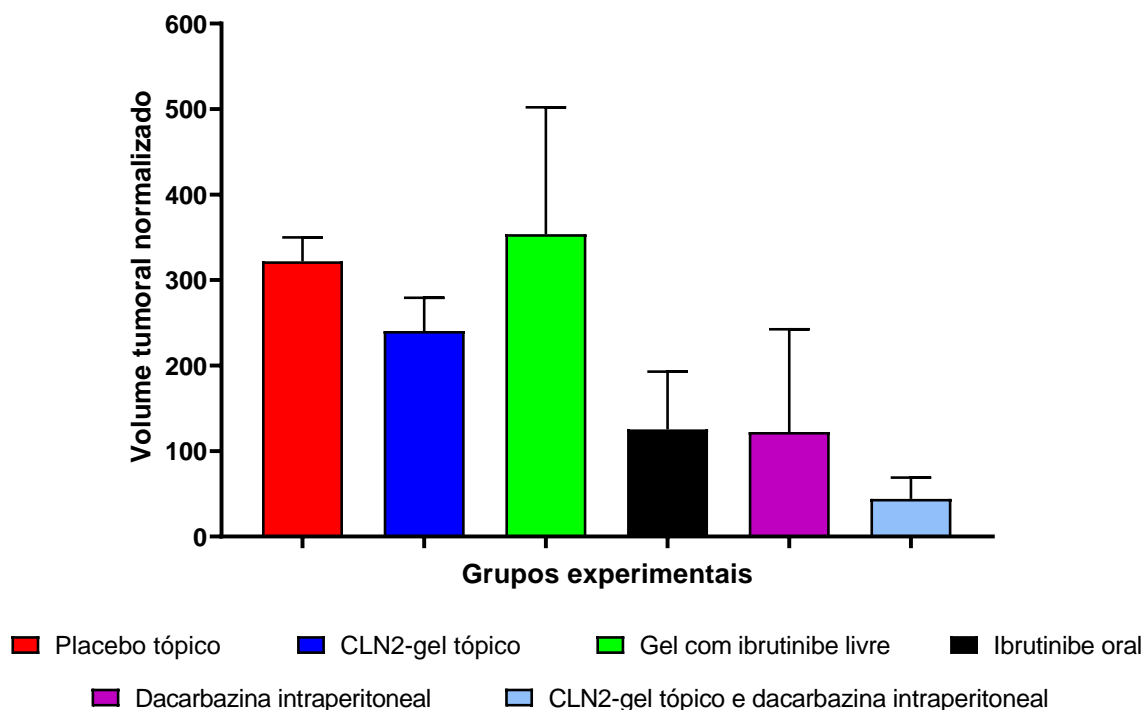


**Figura 42:** Representação gráfica da evolução tumoral, expressa pelos volumes tumorais normalizados dos grupos: A) tratado com placebo por via tópica (vermelho), tratados com dacarbazina intraperitoneal (roxo) e tratados com ibrutinibe por via oral (preto); B) placebo tópico (vermelho), tratados com gel contendo ibrutinibe livre por via tópica (verde) e tratados com CLN2-gel tópico (azul); C) tratados com CLN2-gel tópico (azul) e ibrutinibe oral (preto); D) tratados com dacarbazina intraperitoneal (roxo) e tratados com terapia combinada, composta de CLN2-gel tópico e dacarbazina intraperitoneal (azul claro). Os volumes tumorais foram calculados ao longo do tempo (dias) e normalizados pelo volume tumoral no dia do diagnóstico clínico do melanoma, para cada camundongo.

Em todos os animais, o volume tumoral aumentou ao longo do tempo. Entretanto, as diferenças entre os grupos só foram estatisticamente significativas no 13º dia após o transplante celular.

No grupo placebo, ao final do 13º dia (Figuras 42A e 44A), o volume tumoral normalizado apresentou uma média de  $325,9 \pm 32,8$ . Vale destacar que, no 11º dia após o transplante, esse

valor foi de  $80,7 \pm 45,1$ , representando um aumento de aproximadamente 4 vezes em relação ao volume tumoral entre os dias 11 e 13. Esse crescimento acelerado destaca a rápida progressão tumoral nesse modelo experimental.



**Figura 43:** Representação gráfica do volume tumoral normalizado ao final do 13º após o transplante celular.

Já no grupo controle positivo, tratado com a terapia convencional (dacarbazina 80 mg/kg, via intraperitoneal, em dias alternados; Figuras 42A e 44B), o desenvolvimento tumoral foi mais lento, conforme esperado<sup>104,105</sup>. Nesse grupo, o volume tumoral ajustado no dia final do experimento foi de  $53,8 \pm 42,6$ , representando uma redução estatisticamente significativa no desenvolvimento do tumor em relação ao grupo placebo ( $p=0,0003$ , Test T de Student). Essa progressão mais lenta do volume tumoral também pode ser observada na comparação entre os dias 11 e 13. No 11º dia após o transplante, o volume tumoral era de  $28,6 \pm 20,1$ , representando um aumento de aproximadamente 1,9 vezes até o dia 13.

Semelhante ao grupo tratado com dacarbazina, o ibrutinibe por via oral (Figuras 42A e 44C) também teve um impacto significativo no desenvolvimento tumoral quando comparado com o grupo placebo. Ao final do experimento, a média do volume tumoral normalizado foi de  $82,8 \pm 72,6$  ( $p=0,0032$ , Test T de Student, comparação com o grupo placebo). Quando comparado com o grupo tratado com dacarbazina, não houve diferença estatística entre os dois grupos

( $p=0,5173$ , Test T de Student), sugerindo que o ibrutinibe apresenta uma eficácia terapêutica relevante dentro do modelo experimental avaliado.

Esses achados eram esperados, uma vez que estudos recentes têm reforçado o potencial terapêutico do ibrutinibe no tratamento de tumores sólidos. Especificamente no caso de melanoma, estudos *in vitro* demonstraram que o ibrutinibe pode reduzir a viabilidade celular, possivelmente induzir a apoptose, alterar o potencial de membrana mitocondrial, ativar vias apoptóticas, como a via da caspase-3, inibir a replicação celular e reduzir a migração de células de melanoma<sup>133</sup>. Entretanto, em modelos *in vivo*, como no melanoma induzido com células B16-F1, a administração isolada de ibrutinibe não foi suficiente para gerar uma diferença estatística no crescimento tumoral<sup>106</sup>.

A diferença entre esses resultados e os obtidos no presente estudo pode estar relacionada à diferença na linhagem celular utilizada. É fundamental investigar detalhadamente os mecanismos de morte celular envolvidos em cada linhagem para compreender melhor em quais condições o ibrutinibe pode ser eficaz. Embora seu principal mecanismo de ação seja a inibição da BTK, outros mecanismos também foram descritos, como inibição da HER2<sup>134</sup> ou da EGFR<sup>107</sup>. Este último mecanismo, por exemplo, tem sido descrito como determinante para a inibição de outros modelos tumorais, como os induzidos por células H1975, modelo de câncer de pulmão<sup>107</sup> e em modelos de câncer de mama murino<sup>18</sup>.

Além disso, também é relatada a ação do ibrutinibe em modular a ação do sistema imune, aumentando a produção de citocinas como IL-2 e citocinas do tipo Th1. Isso estimula a proliferação de linfócitos T e aumentam a produção de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-6, o que contribui para a sua ação antitumoral<sup>18,135</sup>.

Por outro lado, no grupo tratado com gel simples contendo o ibrutinibe disperso para aplicação tópica (Figuras 42B e 44D), não foi observada diferença estatística significativa em comparação com o grupo placebo ( $353,8 \pm 148,3$  versus  $325,9 \pm 32,8$ , respectivamente;  $p=0,7678$ , Test T de Student). Isso indica que a via de administração influencia a eficácia do ibrutinibe, sendo a formulação oral mais eficaz que a aplicação tópica em gel simples.

Entretanto, ao analisarmos o grupo tratado com CLN2-gel (Figuras 42B e 44E), observamos que o volume tumoral normalizado ( $240,3 \pm 39,07$ ) foi estatisticamente menor que no grupo placebo ( $325,9 \pm 32,8$ ,  $p=0,0282$ , Test T de Student), apesar de se tratar de uma formulação tópica. Esses resultados reforçam a importância do uso de carreadores lipídicos nanoestruturados para incorporação do ibrutinibe como estratégia para favorecer a penetração

cutânea do fármaco. Assim, esse resultado corroboram os dados de penetração cutânea obtidos nesse estudo (Seção 5.12), destacando o potencial do CLN2-gel como estratégia para administração tópica do ibrutinibe.

O uso da nanotecnologia como indutor de permeação cutânea já é amplamente descrito na literatura. Estudos prévios demonstram essa abordagem com fármacos utilizados na terapia tópica, como o 5-fluororacil, aprovado para o tratamento tópico de cânceres de pele do tipo não melanoma. Modelos *in vivo* mostram que formulações nanoestruturadas, como em nanocápsulas, aumentam o acúmulo do fármaco no estrato córneo e nos anexos cutâneos de camundongos, além de serem capturados por células Langerhans<sup>136</sup>. Da mesma forma, nanopartículas lipídicas demonstraram o seu potencial para melhorar a ação do imiquimod<sup>13</sup>.

Além disso, o uso dos CLN mostrou-se efetivo na promoção da permeação cutânea de fármacos que, originalmente, não são administrados por via tópica. Esse efeito foi observado, por exemplo, com o paclitaxel, que apresentou atividade antitumoral em modelos *in vivo* de câncer de pele não melanoma<sup>13</sup>.

Ao compararmos o grupo tratado com ibrutinibe por via oral com o grupo tratado com CLN2-gel (Figura 42C), observamos que o desenvolvimento tumoral foi estatisticamente menor no grupo tratado por via oral ( $p=0,0088$ , Test T de Student). Esse resultado indica que, apesar dos achados desse experimento indicarem que o ibrutinibe por via tópica possa ser uma abordagem terapêutica promissora, a formulação não atingiu a eficácia máxima que o ibrutinibe poderia apresentar nesse modelo experimental.

A comparação entre uma via de administração sistêmica (oral) e a via tópica (CLN2-gel) fornece informações sobre possíveis melhorias na formulação, como o aumento da concentração de ibrutinibe como estratégia para ampliar a sua biodisponibilidade. Estudos que compararam a aplicação tópica de agentes antineoplásicos em diferentes concentrações demonstraram que a eficácia terapêutica pode ser dose-dependente<sup>137</sup>. No entanto, outros estudos indicaram que o aumento da concentração do fármaco na formulação nem sempre resulta em um benefício terapêutico adicional<sup>138</sup>. Vale ressaltar que o aumento da dose aplicada pode elevar o risco de reações adversas, tornando essencial uma avaliação criteriosa desse ajuste.

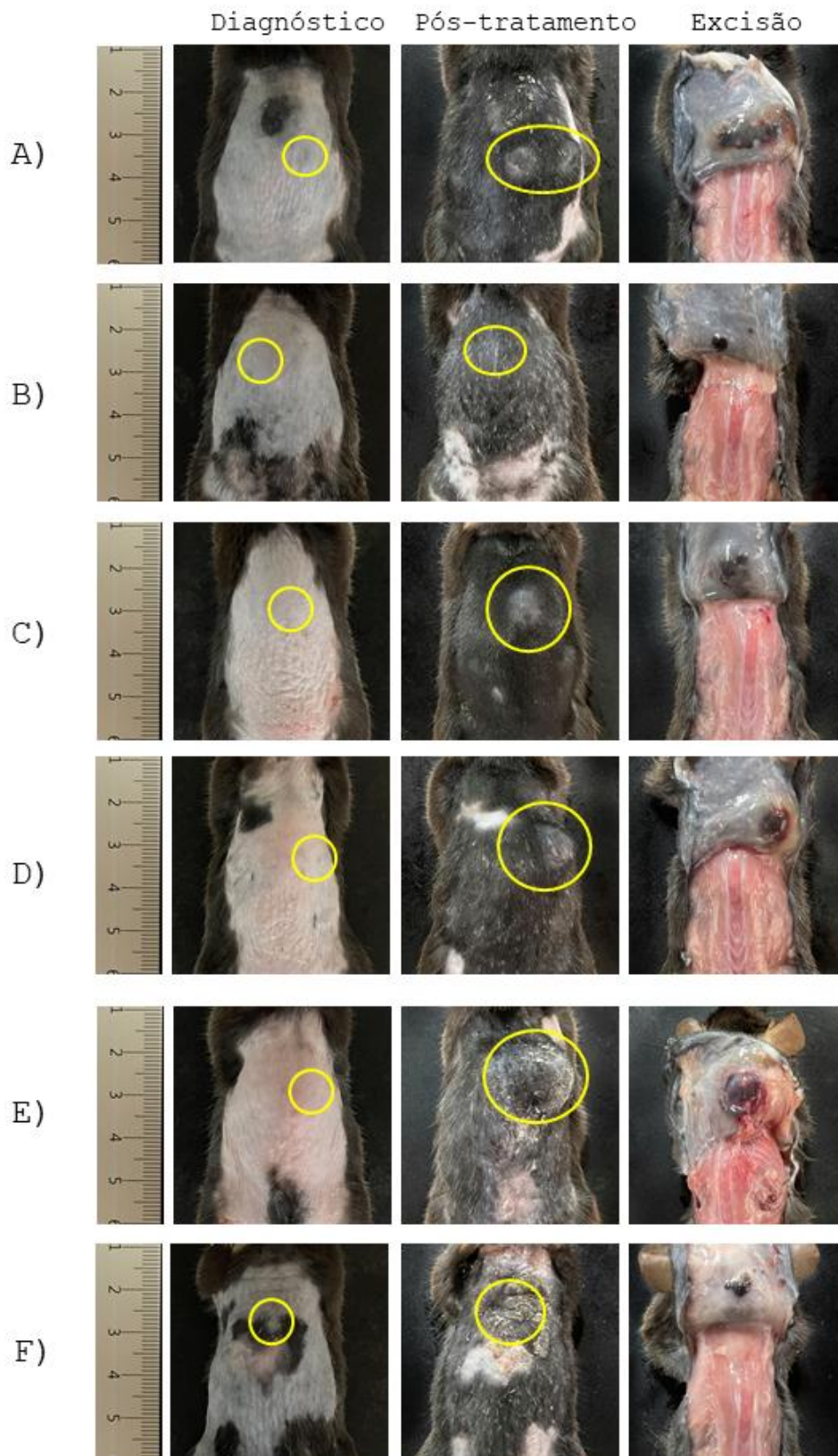
Outro aspecto a ser analisado são os desafios relacionados ao modelo experimental avaliado. Como as células tumorais são transplantadas no subcutâneo dos camundongos, uma parcela significativa de ibrutinibe biodisponível na derme e epiderme, locais onde o melanoma se inicia,

pode ter sido rapidamente removida pela circulação sistêmica antes de atingir o tumor, reduzindo a sua concentração no sítio de ação<sup>139</sup>.

Portanto, apesar dos resultados promissores, esses dados também evidenciam a necessidade de novos estudos, avaliando diferentes concentrações de ibrutinibe na formulação para otimizar sua eficácia para a aplicação tópica.

Ao analisarmos o último grupo estudado, que avaliou o impacto da formulação contendo CLN2-gel como terapia adjuvante (Figuras 42D e 44F), observamos que não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo tratado apenas com dacarbazina ( $p=0,5173$ , Test T de Student). No entanto, apesar da ausência de diferença estatística entre os grupos, o volume tumoral ajustado no grupo que recebeu a terapia combinada apresentou uma tendência a ser menor (volume no 13º dia:  $44,0 \pm 24,9$ ) quando comparado ao grupo tratado apenas com dacarbazina (volume no 13º dia:  $53,8 \pm 42,6$ ). Esses dados indicam que a formulação CLN2-gel pode potencializar os efeitos quimioterápicos, embora mais estudos sejam necessários para confirmar a hipótese.

Ao analisarmos a progressão do tumor ao longo do tempo, observamos que, para o grupo tratado apenas com dacarbazina intraperitoneal, houve um crescimento estatisticamente significativo entre os dias 9 ( $28,6 \pm 20,1$ ) e 13 ( $53,8 \pm 42,6$ ;  $p=0,0104$ , ANOVA), indicando uma tendência de crescimento tumoral nesse período. Além disso, no mesmo grupo, o volume tumoral aumentou de aproximadamente 1,9 vezes entre os dias 11 e 13.



**Figura 44:** Registro fotográfico dos tumores nos diferentes momentos do experimento: no dia do diagnóstico clínico (coluna esquerda), no dia da eutanásia (coluna central) e após a excisão do tumor (coluna direita). As imagens correspondem aos grupos: não-tratados (A), tratados com dacarbazina (B), tratados com ibrutinibe por via oral (C), tratados com CLN2-gel tópico (D), tratados com gel simples contendo ibrutinibe disperso para aplicação tópica (E) e tratados com terapia combinada de dacarbazina e CLN2-gel (F).

Por outro lado, no grupo tratado com a terapia combinada, não houve diferença entre os dias 9 ( $37,9 \pm 38,3$ ) e 13 ( $44,0 \pm 24,9$ ;  $p=0,2085$ , ANOVA), sugerindo uma tendência em estabilizar o volume tumoral. Além disso, o aumento no volume tumoral entre os dias 11 e dia 13 foi de aproximadamente 1,1, reforçando a hipótese de que a associação de CLN2-gel com a dacarbazina pode ajudar a conter a progressão do melanoma.

Resultados semelhantes já foram descritos na literatura com a associação do ibrutinibe com outras classes de quimioterápicos. Por exemplo, a associação do ibrutinibe com anti-PD-L1 resultou em uma redução significativa no desenvolvimento de melanoma B16-F1 em camundongos, quando comparado com o uso isolado dos fármacos<sup>106</sup>. Esse efeito também foi observado em modelos tumorais induzidos com células de linfoma<sup>18</sup>.

Apesar dessas observações, como os volumes tumorais nesses grupos estavam relativamente pequenos, enquanto em outros grupos os tumores já se aproximavam do ponto final humanitário estabelecido para o estudo, não foi possível detectar uma diferença clara entre os dois grupos no período avaliado. No entanto, nossos dados sugerem que a terapia combinada pode influenciar na progressão tumoral a longo prazo, abrindo caminho para futuros estudos com um período experimental prolongado, a fim de avaliar com maior precisão os benefícios da formulação CLN2-gel como terapia adjuvante.

## **7. CONCLUSÕES**

---

Inicialmente, o estudo obteve sucesso no desenvolvimento e na validação de um método analítico para detecção e quantificação do ibrutinibe em amostras de pele. O método possibilitou uma quantificação simples e rápida do ibrutinibe na presença dos contaminantes de pele, sendo, portanto, útil para utilização em ensaios de permeação cutânea no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças cutâneas com o fármaco.

Os estudos de compatibilidade entre o ibrutinibe e os excipientes selecionados para produção dos CLN demonstraram a viabilidade de utilização desses excipientes em preparações farmacêuticas. O estudo também obteve sucesso na produção de duas composições distintas de CLN, utilizando óleos com características distintas, destacando a importância da solubilização do ibrutinibe para uma permeação aprimorada e liberação controlada do fármaco. De fato, a formulação CLN2 promoveu efetivamente a permeação do ibrutinibe em camadas mais profundas da pele ao longo de um período prolongado em comparação com o CLN1, no qual o ibrutinibe não é completamente solúvel. Além disso, a melhoria da fluidez dos lipídeos no estrato córneo enfatizou o impacto da formulação na permeação e hidratação da pele. Os CLN demonstraram alguma segurança para aplicação tópica demonstrada pelo ensaio HET-CAM. Assim, o estudo até este ponto revela a importância do produto tópico desenvolvido, abrindo novos caminhos para avanços na terapia do melanoma.

O estudo obteve sucesso na incorporação da formulação CLN2 em um hidrogel à base de CMC, como forma de viabilizar a aplicação tópica em uma situação *in vivo*. Diferentes concentrações de CMC foram avaliadas quanto às características físicas da formulação, avaliadas por ensaios reológicos. Os resultados indicaram que a formulação selecionada deverá apresentar boa adesão à pele e facilidade de espalhamento quando da aplicação. Além disso, os estudos preliminares de estabilidade física demonstraram que todas as formulações contendo CMC mantiveram boa estabilidade quando armazenadas sob refrigeração.

O presente estudo também demonstrou a eficácia da formulação desenvolvida (CLN2-gel) no tratamento de melanoma em modelo *in vivo*. Tumores foram induzidos em camundongos C57BL/6 por meio do transplante subcutâneo de células B16F10, e o tratamento consistiu na aplicação diária da formulação desenvolvida. Os resultados foram comparados com diferentes grupos experimentais, incluindo camundongos que receberam a administração de uma formulação placebo, formulação tópica sem tecnologia para incorporação do ibrutinibe, ibrutinibe administrado por via oral, dacarbazina (medicamento de referência para o tratamento de melanoma) e a combinação de dacarbazina com CLN2-gel.

O estudo demonstrou o efeito da administração tópica de CLN2-gel em camundongos, com resultados promissores. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade do ibrutinibe

em diminuir a progressão tumoral. Além disso, foi evidenciado que a formulação tópica desenvolvida no presente estudo foi essencial para viabilizar a permeação cutânea do ibrutinibe. Ainda, o estudo demonstrou o efeito benéfico da administração de CLN2-gel como terapia adjuvante ao tratamento do melanoma.

Diante dos resultados, este trabalho ressalta a necessidade de estudos adicionais para elucidar melhor os mecanismos de ação envolvidos na inibição da progressão tumoral e compreender melhor o papel da administração tópica do ibrutinibe na terapia adjuvante.

Por fim, vale ressaltar que esse estudo explorou uma abordagem terapêutica inédita, uma vez que não há registro na literatura científica sobre a aplicação tópica do ibrutinibe para qualquer doença, especialmente para o tratamento de melanoma. Assim, além de contribuir significativamente para o avanço do conhecimento científico, este trabalho abre caminho para o desenvolvimento de uma terapia eficaz, segura e de fácil aplicação para o tratamento de melanoma.

## **8. REFERÊNCIAS**

---

- (1) Catalano, O.; Roldán, F. A.; Varelli, C.; Bard, R.; Corvino, A.; Wortsman, X. Skin Cancer: Findings and Role of High-Resolution Ultrasound. *J Ultrasound* **2019**, *22* (4), 423–431. <https://doi.org/10.1007/s40477-019-00379-0>.
- (2) Schadendorf, D.; Fisher, D. E.; Garbe, C.; Gershenwald, J. E.; Grob, J.-J.; Halpern, A.; Herlyn, M.; Marchetti, M. A.; McArthur, G.; Ribas, A.; Roesch, A.; Hauschild, A. Melanoma. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1* (1), 15003. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>.
- (3) Shain, A. H.; Bastian, B. C. From Melanocytes to Melanomas. *Nat Rev Cancer* **2016**, *16* (6), 345–358. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>.
- (4) Yamaguchi, Y.; Hearing, V. J. Melanocytes and Their Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2014**, *4* (5), a017046–a017046. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017046>.
- (5) Bertrand, J.; Steingrimsson, E.; Jouenne, F.; Paillerets, B.; Larue, L. Melanoma Risk and Melanocyte Biology. *Acta Derm Venereol* **2020**, *100* (11), adv00139. <https://doi.org/10.2340/00015555-3494>.
- (6) Saginala, K.; Barsouk, A.; Aluru, J. S.; Rawla, P.; Barsouk, A. Epidemiology of Melanoma. *Medical Sciences* **2021**, *9* (4), 63. <https://doi.org/10.3390/medsci9040063>.
- (7) Gutzmer, R.; Stroyakovskiy, D.; Gogas, H.; Robert, C.; Lewis, K.; Protsenko, S.; Pereira, R. P.; Eigentler, T.; Rutkowski, P.; Demidov, L.; Manikhas, G. M.; Yan, Y.; Huang, K.-C.; Uyei, A.; McNally, V.; McArthur, G. A.; Ascierto, P. A. Atezolizumab, Vemurafenib, and Cobimetinib as First-Line Treatment for Unresectable Advanced BRAFV600 Mutation-Positive Melanoma (IMspire150): Primary Analysis of the Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *The Lancet* **2020**, *395* (10240), 1835–1844. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30934-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30934-X).
- (8) Ostrowski, S. M.; Fisher, D. E. Biology of Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **2021**, *35* (1), 29–56. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.08.010>.
- (9) Patton, E. E.; Mueller, K. L.; Adams, D. J.; Anandasabapathy, N.; Aplin, A. E.; Bertolotto, C.; Bosenberg, M.; Ceol, C. J.; Burd, C. E.; Chi, P.; Herlyn, M.; Holmen, S. L.; Karreth, F. A.; Kaufman, C. K.; Khan, S.; Kobold, S.; Leucci, E.; Levy, C.; Lombard, D. B.; Lund, A. W.; Marie, K. L.; Marine, J.-C.; Marais, R.; McMahan, M.; Robles-Espinoza, C. D.; Ronai, Z. A.; Samuels, Y.; Soengas, M. S.; Villanueva, J.; Weeraratna, A. T.; White, R. M.; Yeh, I.; Zhu, J.; Zon, L. I.; Hurlbert, M. S.; Merlino, G. Melanoma Models for the next Generation of Therapies. *Cancer Cell* **2021**, *39* (5), 610–631. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.01.011>.
- (10) Eggermont, A. M. M.; Chiarion-Sileni, V.; Grob, J.-J.; Dummer, R.; Wolchok, J. D.; Schmidt, H.; Hamid, O.; Robert, C.; Ascierto, P. A.; Richards, J. M.; Lebbe, C.; Ferraresi, V.; Smylie, M.; Weber, J. S.; Maio, M.; Hosein, F.; De Pril, V.; Kicinski, M.; Suci, S.; Testori, A. Adjuvant Ipilimumab versus Placebo after Complete Resection of Stage III Melanoma: Long-Term Follow-up Results of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 18071 Double-Blind Phase 3 Randomised Trial. *European Journal of Cancer* **2019**, *119*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.07.001>.
- (11) Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.-J.; Rutkowski, P.; Lao, C. D.; Cowey, C. L.; Schadendorf, D.; Wagstaff, J.; Dummer, R.; Ferrucci, P. F.; Smylie, M.; Hogg, D.; Hill, A.; Márquez-Rodas, I.; Haanen, J.; Guidoboni, M.; Maio, M.; Schöffski, P.; Carlino, M. S.; Lebbé, C.; McArthur, G.; Ascierto, P. A.; Daniels, G. A.; Long, G. V.; Bastholt, L.; Rizzo, J. I.; Balogh, A.; Moshyk, A.; Hodi, F. S.; Wolchok, J. D. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* **2019**, *381* (16), 1535–1546. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910836>.

- (12) Tawbi, H. A.; Forsyth, P. A.; Algazi, A.; Hamid, O.; Hodi, F. S.; Moschos, S. J.; Khushalani, N. I.; Lewis, K.; Lao, C. D.; Postow, M. A.; Atkins, M. B.; Ernstoff, M. S.; Reardon, D. A.; Puzanov, I.; Kudchadkar, R. R.; Thomas, R. P.; Tarhini, A.; Pavlick, A. C.; Jiang, J.; Avila, A.; Demelo, S.; Margolin, K. Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain. *N Engl J Med* **2018**, *379* (8), 722–730. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805453>.
- (13) Brandt, M. G.; Moore, C. C. Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* **2019**, *27* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2018.08.001>.
- (14) Roskoski, R. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors. *Pharmacological Research* **2019**, *144*, 19–50. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.006>.
- (15) Burger, J. A. Bruton Tyrosine Kinase Inhibitors: Present and Future. *Cancer J* **2019**, *25* (6), 386–393. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000412>.
- (16) Zhao, L.; Tang, B.; Tang, P.; Sun, Q.; Suo, Z.; Zhang, M.; Gan, N.; Yang, H.; Li, H. Chitosan/Sulfobutylether- $\beta$ -Cyclodextrin Nanoparticles for Ibrutinib Delivery: A Potential Nanoformulation of Novel Kinase Inhibitor. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**, *109* (2), 1136–1144. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.007>.
- (17) Molina-Cerrillo, J.; Alonso-Gordoa, T.; Gajate, P.; Grande, E. Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) as a Promising Target in Solid Tumors. *Cancer Treatment Reviews* **2017**, *58*, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.06.001>.
- (18) Varikuti, S.; Singh, B.; Volpedo, G.; Ahirwar, D. K.; Jha, B. K.; Saljoughian, N.; Viana, A. G.; Verma, C.; Hamza, O.; Halsey, G.; Holcomb, E. A.; Maryala, R. J.; Oghumu, S.; Ganju, R. K.; Satoskar, A. R. Ibrutinib Treatment Inhibits Breast Cancer Progression and Metastasis by Inducing Conversion of Myeloid-Derived Suppressor Cells to Dendritic Cells. *Br J Cancer* **2020**, *122* (7), 1005–1013. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0743-8>.
- (19) Luo, Q.-Y.; Zhou, S.-N.; Pan, W.-T.; Sun, J.; Yang, L.-Q.; Zhang, L.; Qiu, M.-Z.; Yang, D.-J. A Multi-Kinase Inhibitor APG-2449 Enhances the Antitumor Effect of Ibrutinib in Esophageal Squamous Cell Carcinoma via EGFR/FAK Pathway Inhibition. *Biochemical Pharmacology* **2021**, *183*, 114318. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114318>.
- (20) Ganatra, S.; Sharma, A.; Shah, S.; Chaudhry, G. M.; Martin, D. T.; Neilan, T. G.; Mahmood, S. S.; Barac, A.; Groarke, J. D.; Hayek, S. S.; Dani, S.; Venesy, D.; Patten, R.; Nohria, A. Ibrutinib-Associated Atrial Fibrillation. *JACC: Clinical Electrophysiology* **2018**, *4* (12), 1491–1500. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2018.06.004>.
- (21) Lasica, M.; Tam, C. S. Management of Ibrutinib Toxicities: A Practical Guide. *Curr Hematol Malig Rep* **2020**, *15* (3), 177–186. <https://doi.org/10.1007/s11899-020-00576-3>.
- (22) Ashar, F.; Hani, U.; Osmani, R. A. M.; Kazim, S. M.; Selvamuthukumar, S. Preparation and Optimization of Ibrutinib-Loaded Nanoliposomes Using Response Surface Methodology. *Polymers* **2022**, *14* (18), 3886. <https://doi.org/10.3390/polym14183886>.
- (23) Yang, Z.; Du, Y.; Lei, L.; Xia, X.; Wang, X.; Tong, F.; Li, Y.; Gao, H. Co-Delivery of Ibrutinib and Hydroxychloroquine by Albumin Nanoparticles for Enhanced Chemotherapy of Glioma. *International Journal of Pharmaceutics* **2023**, *630*, 122436. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122436>.
- (24) Metzler, J. M.; Burla, L.; Fink, D.; Imesch, P. Ibrutinib in Gynecological Malignancies and Breast Cancer: A Systematic Review. *IJMS* **2020**, *21* (11), 4154. <https://doi.org/10.3390/ijms21114154>.
- (25) Simões, M. F.; Nogueira, B. A.; Tabanez, A. M.; Fausto, R.; Pinto, R. M. A.; Simões, S. Enhanced Solid-State Stability of Amorphous Ibrutinib Formulations Prepared by Hot-Melt Extrusion. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, *579*, 119156. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119156>.

- (26) Csányi, E.; Bakonyi, M.; Kovács, A.; Budai-Szűcs, M.; Csóka, I.; Berkó, S. Development of Topical Nanocarriers for Skin Cancer Treatment Using Quality by Design Approach. *Curr Med Chem* **2019**, *26* (35), 6440–6458. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181116143713>.
- (27) Angelo, T.; Pires, F. Q.; Gelfuso, G. M.; Da Silva, J. K. R.; Gratieri, T.; Cunha-Filho, M. S. S. Development and Validation of a Selective HPLC-UV Method for Thymol Determination in Skin Permeation Experiments. *Journal of Chromatography B* **2016**, *1022*, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.011>.
- (28) Simonetti, L. D. D.; Gelfuso, G. M.; Barbosa, J. C. R.; Lopez, R. F. V. Assessment of the Percutaneous Penetration of Cisplatin: The Effect of Monoolein and the Drug Skin Penetration Pathway. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *73* (1), 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.04.016>.
- (29) Shakeel, F.; Salem-Bekhit, M. M.; Iqbal, M.; Haq, N. Solubility and Thermodynamic Function of a New Anticancer Drug Ibrutinib in 2-(2-Ethoxyethoxy)Ethanol+water Mixtures at Different Temperatures. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **2015**, *89*, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2015.04.014>.
- (30) Mahant, S.; Rao, R.; Souto, E. B.; Nanda, S. Analytical Tools and Evaluation Strategies for Nanostructured Lipid Carrier-Based Topical Delivery Systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2020**, *17* (7), 963–992. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1772750>.
- (31) Ferreira-Nunes, R.; Silva, S. M. M. D.; Souza, P. E. N. D.; Magalhães, P. D. O.; Cunha-Filho, M.; Gratieri, T.; Gelfuso, G. M. Incorporation of Eugenia Dysenterica Extract in Microemulsions Preserves Stability, Antioxidant Effect and Provides Enhanced Cutaneous Permeation. *Journal of Molecular Liquids* **2018**, *265*, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.023>.
- (32) Pereira, M. N.; Tolentino, S.; Pires, F. Q.; Anjos, J. L. V.; Alonso, A.; Gratieri, T.; Cunha-Filho, M.; Gelfuso, G. M. Nanostructured Lipid Carriers for Hair Follicle-Targeted Delivery of Clindamycin and Rifampicin to Hidradenitis Suppurativa Treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2021**, *197*, 111448. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111448>.
- (33) Casarini, T. P. A.; Frank, L. A.; Benin, T.; Onzi, G.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Innovative Hydrogel Containing Polymeric Nanocapsules Loaded with Phloretin: Enhanced Skin Penetration and Adhesion. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *120*, 111681. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111681>.
- (34) Waghule, T.; Rapalli, V. K.; Gorantla, S.; Saha, R. N.; Dubey, S. K.; Puri, A.; Singhvi, G. Nanostructured Lipid Carriers as Potential Drug Delivery Systems for Skin Disorders. *CPD* **2020**, *26* (36), 4569–4579. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200614175236>.
- (35) Elmowafy, M. Skin Penetration/Permeation Success Determinants of Nanocarriers: Pursuit of a Perfect Formulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2021**, *203*, 111748. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111748>.
- (36) Alexander, A.; Dwivedi, S.; Ajazuddin; Giri, T. K.; Saraf, S.; Saraf, S.; Tripathi, D. K. Approaches for Breaking the Barriers of Drug Permeation through Transdermal Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* **2012**, *164* (1), 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.09.017>.
- (37) Quan, T. Molecular Insights of Human Skin Epidermal and Dermal Aging. *Journal of Dermatological Science* **2023**, *112* (2), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2023.08.006>.
- (38) Losquadro, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* **2017**, *25* (3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>.

- (39) Phatale, V.; Vaiphei, K. K.; Jha, S.; Patil, D.; Agrawal, M.; Alexander, A. Overcoming Skin Barriers through Advanced Transdermal Drug Delivery Approaches. *Journal of Controlled Release* **2022**, *351*, 361–380. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.025>.
- (40) Bouwstra, J. A.; Nădăban, A.; Bras, W.; McCabe, C.; Bunge, A.; Gooris, G. S. The Skin Barrier: An Extraordinary Interface with an Exceptional Lipid Organization. *Progress in Lipid Research* **2023**, *92*, 101252. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2023.101252>.
- (41) Darp, R.; Ceol, C. Making a Melanoma: Molecular and Cellular Changes Underlying Melanoma Initiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2021**, *34* (2), 280–287. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12950>.
- (42) Quaresmini, D.; Guida, M. Neoangiogenesis in Melanoma: An Issue in Biology and Systemic Treatment. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 584903. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.584903>.
- (43) Davis, L. E.; Shalin, S. C.; Tackett, A. J. Current State of Melanoma Diagnosis and Treatment. *Cancer Biology & Therapy* **2019**, *20* (11), 1366–1379. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>.
- (44) Margolis, N.; Markovits, E.; Markel, G. Reprogramming Lymphocytes for the Treatment of Melanoma: From Biology to Therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2019**, *141*, 104–124. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.06.005>.
- (45) Khazaei, Z.; Ghorat, F.; Jarrahi, A. M.; Adineh, H. A.; Sohrabivafa, M.; Goodarzi, E. Global Incidence and Mortality of Skin Cancer by Histological Subtype and Its Relationship with the Human Development Index (HDI) - an Ecology Study in 2018.
- (46) Li, X.-Y.; Tan, L.-C.; Dong, L.-W.; Zhang, W.-Q.; Shen, X.-X.; Lu, X.; Zheng, H.; Lu, Y.-G. Susceptibility and Resistance Mechanisms During Photodynamic Therapy of Melanoma. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 597. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00597>.
- (47) Carr, S.; Smith, C.; Wernberg, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surgical Clinics of North America* **2020**, *100* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005>.
- (48) Raimondi, S.; Suppa, M.; Gandini, S. Melanoma Epidemiology and Sun Exposure. *Acta Derm Venereol* **2020**, *100* (11), adv00136. <https://doi.org/10.2340/00015555-3491>.
- (49) Leonardi, G.; Falzone, L.; Salemi, R.; Zanghi, A.; Spandidos, D.; Mccubrey, J.; Candido, S.; Libra, M. Cutaneous Melanoma: From Pathogenesis to Therapy (Review). *Int J Oncol* **2018**. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>.
- (50) Yeh, I.; Bastian, B. C. Melanoma Pathology: New Approaches and Classification\*. *Br J Dermatol* **2021**, *185* (2), 282–293. <https://doi.org/10.1111/bjd.20427>.
- (51) Wang, J. D.; Chen, X. Y.; Ji, K. W.; Tao, F. Targeting Btk with Ibrutinib Inhibit Gastric Carcinoma Cells Growth.
- (52) Satish, T.; Khan, S.; Levin, M.; Carvajal, R.; Yoon, A. J. Treatment of Recurrent Mucosal Melanoma of the Oral Cavity with Topical Imiquimod and Pembrolizumab Achieves Complete Histopathologic Remission. *J Immunother Cancer* **2021**, *9* (10), e001219. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001219>.
- (53) Ascierto, P. A.; Del Vecchio, M.; Mandalá, M.; Gogas, H.; Arance, A. M.; Dalle, S.; Cowey, C. L.; Schenker, M.; Grob, J.-J.; Chiarion-Sileni, V.; Márquez-Rodas, I.; Butler, M. O.; Maio, M.; Middleton, M. R.; De La Cruz-Merino, L.; Arenberger, P.; Atkinson, V.; Hill, A.; Fecher, L. A.; Millward, M.; Khushalani, N. I.; Queirolo, P.; Lobo, M.; De Pril, V.; Loffredo, J.; Larkin, J.; Weber, J. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage IIIB–C and Stage IV Melanoma (CheckMate 238): 4-Year Results from a Multicentre, Double-Blind, Randomised, Controlled, Phase 3 Trial. *The Lancet Oncology* **2020**, *21* (11), 1465–1477. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30494-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30494-0).
- (54) Robert, C.; Ribas, A.; Schachter, J.; Arance, A.; Grob, J.-J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M. S.; McNeil, C. M.; Lotem, M.; Larkin, J. M. G.; Lorigan, P.; Neyns, B.; Blank, C. U.; Petrella, T. M.; Hamid, O.; Su, S.-C.; Krepler, C.; Ibrahim, N.; Long, G.

- V. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma (KEYNOTE-006): Post-Hoc 5-Year Results from an Open-Label, Multicentre, Randomised, Controlled, Phase 3 Study. *The Lancet Oncology* **2019**, *20* (9), 1239–1251. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30388-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30388-2).
- (55) Collins, A.; Savas, J.; Doerfler, L. Nonsurgical Treatments for Nonmelanoma Skin Cancer. *Dermatologic Clinics* **2019**, *37* (4), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.det.2019.05.003>.
- (56) Haque, T.; Rahman, K. M.; Thurston, D. E.; Hadgraft, J.; Lane, M. E. Topical Therapies for Skin Cancer and Actinic Keratosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, *77*, 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.06.013>.
- (57) Cullen, J. K.; Simmons, J. L.; Parsons, P. G.; Boyle, G. M. Topical Treatments for Skin Cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2020**, *153*, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.11.002>.
- (58) Naidoo, C.; Kruger, C. A.; Abrahamse, H. Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma Treatment: A Review. *Technol Cancer Res Treat* **2018**, *17*, 153303381879179. <https://doi.org/10.1177/1533033818791795>.
- (59) Pomerantz, H.; Korgavkar, K.; Lee, K. C.; Lew, R.; Weinstock, M. A.; VAKCC Trial Group. Validation of Photograph-Based Toxicity Score for Topical 5-Fluorouracil Cream Application. *J Cutan Med Surg* **2016**, *20* (5), 458–466. <https://doi.org/10.1177/1203475416643952>.
- (60) Rosenberg, A. R.; Tabacchi, M.; Ngo, K. H.; Wallendorf, M.; Rosman, I. S.; Cornelius, L. A.; Demehri, S. Skin Cancer Precursor Immunotherapy for Squamous Cell Carcinoma Prevention. *JCI Insight* **2019**, *4* (6), e125476. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125476>.
- (61) Druker, B. J.; Talpaz, M.; Resta, D. J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J. M.; Lydon, N. B.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; Sawyers, C. L. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **2001**, *344* (14), 1031–1037. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401>.
- (62) Cohen, P. Protein Kinases — the Major Drug Targets of the Twenty-First Century? *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1* (4), 309–315. <https://doi.org/10.1038/nrd773>.
- (63) Wu, H.; Wang, A.; Zhang, W.; Wang, B.; Chen, C.; Wang, W.; Hu, C.; Ye, Z.; Zhao, Z.; Wang, L.; Li, X.; Yu, K.; Liu, J.; Wu, J.; Yan, X.-E.; Zhao, P.; Wang, J.; Wang, C.; Weisberg, E. L.; Gray, N. S.; Yun, C.-H.; Liu, J.; Chen, L.; Liu, Q. Ibrutinib Selectively and Irreversibly Targets EGFR (L858R, Del19) Mutant but Is Moderately Resistant to EGFR (T790M) Mutant NSCLC Cells. *Oncotarget* **2015**, *6* (31), 31313–31322. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5182>.
- (64) Nocco, S.; Andriano, T. M.; Bose, A.; Chilov, M.; Godwin, K.; Dranitsaris, G.; Wu, S.; Lacouture, M. E.; Roeker, L. E.; Mato, A. R.; Markova, A. Ibrutinib-Associated Dermatologic Toxicities: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2022**, *174*, 103696. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103696>.
- (65) Sibaud, V.; Beylot-Barry, M.; Protin, C.; Vigarios, E.; Recher, C.; Ysebaert, L. Dermatological Toxicities of Bruton’s Tyrosine Kinase Inhibitors. *Am J Clin Dermatol* **2020**, *21* (6), 799–812. <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00535-x>.
- (66) Rangaraj, N.; Pailla, S. R.; Shah, S.; Prajapati, S.; Sampathi, S. QbD Aided Development of Ibrutinib-Loaded Nanostructured Lipid Carriers Aimed for Lymphatic Targeting: Evaluation Using Chylomicron Flow Blocking Approach. *Drug Deliv. and Transl. Res.* **2020**, *10* (5), 1476–1494. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00803-7>.
- (67) Rangaraj, N.; Pailla, S. R.; Chowta, P.; Sampathi, S. Fabrication of Ibrutinib Nanosuspension by Quality by Design Approach: Intended for Enhanced Oral

- Bioavailability and Diminished Fast Fed Variability. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20* (8), 326. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1524-7>.
- (68) Pereira, M. N.; Matos, B. N.; Gratieri, T.; Cunha-Filho, M.; Gelfuso, G. M. Development and Validation of a Simple Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Clindamycin Phosphate and Rifampicin in Skin Permeation Studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *159*, 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.007>.
- (69) Yasu, T.; Momo, K.; Yasui, H.; Kuroda, S. Simple Determination of Plasma Ibrutinib Concentration Using High-performance Liquid Chromatography. *Biomedical Chromatography* **2019**, *33* (3), e4435. <https://doi.org/10.1002/bmc.4435>.
- (70) International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*; Tietje, C., Brouder, A., Eds.; Brill | Nijhoff, 2010; pp 1041–1053. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004163300.i-1081.897>.
- (71) Jain, H.; Geetanjali, D.; Dalvi, H.; Bhat, A.; Godugu, C.; Srivastava, S. Liposome Mediated Topical Delivery of Ibrutinib and Curcumin as a Synergistic Approach to Combat Imiquimod Induced Psoriasis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2022**, *68*, 103103. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103103>.
- (72) Sim, Y. S.; Chong, Z. Y.; Azizi, J.; Goh, C. F. Development and Validation of a Gradient HPLC-UV Method for Mitragynine Following in Vitro Skin Permeation Studies. *Journal of Chromatography B* **2022**, *1204*, 123316. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123316>.
- (73) Souto, E. B.; Fangueiro, J. F.; Fernandes, A. R.; Cano, A.; Sanchez-Lopez, E.; Garcia, M. L.; Severino, P.; Paganelli, M. O.; Chaud, M. V.; Silva, A. M. Physicochemical and Biopharmaceutical Aspects Influencing Skin Permeation and Role of SLN and NLC for Skin Drug Delivery. *Heliyon* **2022**, *8* (2), e08938. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08938>.
- (74) Souto, E. B.; Baldim, I.; Oliveira, W. P.; Rao, R.; Yadav, N.; Gama, F. M.; Mahant, S. SLN and NLC for Topical, Dermal, and Transdermal Drug Delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2020**, *17* (3), 357–377. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1727883>.
- (75) Araujo, V. H. S.; Delello Di Filippo, L.; Duarte, J. L.; Spósito, L.; Camargo, B. A. F. D.; Da Silva, P. B.; Chorilli, M. Exploiting Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery against Cutaneous Fungal Infections. *Critical Reviews in Microbiology* **2021**, *47* (1), 79–90. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843399>.
- (76) Wen, J.; Wu, D.; Qin, M.; Liu, C.; Wang, L.; Xu, D.; Vinters, H. V.; Liu, Y.; Kranz, E.; Guan, X.; Sun, G.; Sun, X.; Lee, Y.; Martinez-Maza, O.; Widney, D.; Lu, Y.; Chen, I. S. Y.; Kamata, M. Sustained Delivery and Molecular Targeting of a Therapeutic Monoclonal Antibody to Metastases in the Central Nervous System of Mice. *Nat Biomed Eng* **2019**, *3* (9), 706–716. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0434-z>.
- (77) Jain, P.; Rahi, P.; Pandey, V.; Asati, S.; Soni, V. Nanostructure Lipid Carriers: A Modish Contrivance to Overcome the Ultraviolet Effects. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* **2017**, *4* (2), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2017.02.001>.
- (78) Adnan, M.; Akhter, Md. H.; Afzal, O.; Altamimi, A. S. A.; Ahmad, I.; Alossaimi, M. A.; Jaremko, M.; Emwas, A.-H.; Haider, T.; Haider, Md. F. Exploring Nanocarriers as Treatment Modalities for Skin Cancer. *Molecules* **2023**, *28* (15), 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules28155905>.
- (79) Chauhan, I.; Yasir, M.; Verma, M.; Singh, A. P. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. *Adv Pharm Bull* **2020**, *10* (2), 150–165. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.021>.

- (80) Garcês, A.; Amaral, M. H.; Sousa Lobo, J. M.; Silva, A. C. Formulations Based on Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Cutaneous Use: A Review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, *112*, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.023>.
- (81) Amasya, G.; Aksu, B.; Badilli, U.; Onay-Besikci, A.; Tarimci, N. QbD Guided Early Pharmaceutical Development Study: Production of Lipid Nanoparticles by High Pressure Homogenization for Skin Cancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutics* **2019**, *563*, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.056>.
- (82) Rajinikanth, P.; Chellian, J. Development and Evaluation of Nanostructured Lipid Carrier-Based Hydrogel for Topical Delivery of 5-Fluorouracil. *IJN* **2016**, *Volume 11*, 5067–5077. <https://doi.org/10.2147/IJN.S117511>.
- (83) Kim, S.; Abdella, S.; Abid, F.; Afinjuomo, F.; Youssef, S. H.; Holmes, A.; Song, Y.; Vaidya, S.; Garg, S. Development and Optimization of Imiquimod-Loaded Nanostructured Lipid Carriers Using a Hybrid Design of Experiments Approach. *IJN* **2023**, *Volume 18*, 1007–1029. <https://doi.org/10.2147/IJN.S400610>.
- (84) Soleimani, Y.; Goli, S. A. H.; Varshosaz, J.; Sahafi, S. M. Formulation and Characterization of Novel Nanostructured Lipid Carriers Made from Beeswax, Propolis Wax and Pomegranate Seed Oil. *Food Chemistry* **2018**, *244*, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.010>.
- (85) Sharma, P.; McClees, S.; Afaq, F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. *Molecules* **2017**, *22* (1), 177. <https://doi.org/10.3390/molecules22010177>.
- (86) Talkar, S. S.; Kharkar, P. B.; Patravale, V. B. Docetaxel Loaded Pomegranate Seed Oil Based Nanostructured Lipid Carriers: A Potential Alternative to Current Formulation. *AAPS PharmSciTech* **2020**, *21* (8), 295. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01839-1>.
- (87) Poljšak, N.; Kreft, S.; Kočevar Glavač, N. Vegetable Butters and Oils in Skin Wound Healing: Scientific Evidence for New Opportunities in Dermatology. *Phytotherapy Research* **2020**, *34* (2), 254–269. <https://doi.org/10.1002/ptr.6524>.
- (88) Baccarin, T.; Mitjans, M.; Ramos, D.; Lemos-Senna, E.; Vinardell, M. P. Photoprotection by Punica Granatum Seed Oil Nanoemulsion Entrapping Polyphenol-Rich Ethyl Acetate Fraction against UVB-Induced DNA Damage in Human Keratinocyte (HaCaT) Cell Line. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2015**, *153*, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.09.005>.
- (89) Mota Ferreira, L.; Gehrcke, M.; Ferrari Cervi, V.; Eliete Rodrigues Bitencourt, P.; Ferreira Da Silveira, E.; Hofstatter Azambuja, J.; Prates Ramos, A.; Nascimento, K.; Beatriz Moretto, M.; Braganhol, E.; Rorato Sagrillo, M.; Cruz, L. Pomegranate Seed Oil Nanoemulsions with Selective Antiglioma Activity: Optimization and Evaluation of Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Effects on Mononuclear Cells. *Pharmaceutical Biology* **2016**, *54* (12), 2968–2977. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1199039>.
- (90) Baccarin, T.; Lemos-Senna, E. Potential Application of Nanoemulsions for Skin Delivery of Pomegranate Peel Polyphenols. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (8), 3307–3314. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0818-x>.
- (91) Tung, N.-T.; Vu, V.-D.; Nguyen, P.-L. DoE-Based Development, Physicochemical Characterization, and Pharmacological Evaluation of a Topical Hydrogel Containing Betamethasone Dipropionate Microemulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *181*, 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.002>.
- (92) Alonso, A.; Vasques Da Silva, J.; Tabak, M. Hydration Effects on the Protein Dynamics in Stratum Corneum as Evaluated by EPR Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2003**, *1646* (1–2), 32–41. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00545-9](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00545-9).

- (93) Alonso, A.; Meirelles, N. C.; Yushmanov, V. E.; Tabak, M. Water Increases the Fluidity of Intercellular Membranes of Stratum Corneum: Correlation with Water Permeability, Elastic, and Electrical Resistance Properties. *Journal of Investigative Dermatology* **1996**, *106* (5), 1058–1063. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12338682>.
- (94) Alonso, A.; Meirelles, N. C.; Tabak, M. Effect of Hydration upon the Fluidity of Intercellular Membranes of Stratum Corneum: An EPR Study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, *1237* (1), 6–15. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00069-F](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00069-F).
- (95) De Queirós, W. P.; De Sousa Neto, D.; Alonso, A. Dynamics and Partitioning of Spin-Labeled Stearates into the Lipid Domain of Stratum Corneum. *Journal of Controlled Release* **2005**, *106* (3), 374–385. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.05.009>.
- (96) Alonso, L.; Mendanha, S. A.; Marquezin, C. A.; Berardi, M.; Ito, A. S.; Acuña, A. U.; Alonso, A. Interaction of Miltefosine with Intercellular Membranes of Stratum Corneum and Biomimetic Lipid Vesicles. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *434* (1–2), 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.006>.
- (97) Budil, D. E.; Lee, S.; Saxena, S.; Freed, J. H. Nonlinear-Least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg–Marquardt Algorithm. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1996**, *120* (2), 155–189. <https://doi.org/10.1006/jmra.1996.0113>.
- (98) Luepke, N. P. Hen’s Egg Chorioallantoic Membrane Test for Irritation Potential. *Food and Chemical Toxicology* **1985**, *23* (2), 287–291. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90030-4).
- (99) Angelo, T.; El-Sayed, N.; Jurisic, M.; Koenneke, A.; Gelfuso, G. M.; Cunha-Filho, M.; Taveira, S. F.; Lemor, R.; Schneider, M.; Gratieri, T. Effect of Physical Stimuli on Hair Follicle Deposition of Clobetasol-Loaded Lipid Nanocarriers. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 176. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56760-w>.
- (100) Lin, Y.-Y.; Lee, S.-Y.; Cheng, Y.-J. Low-Level Laser Therapy Induces Melanoma Tumor Growth by Promoting Angiogenesis. *Life* **2023**, *13* (2), 320. <https://doi.org/10.3390/life13020320>.
- (101) Surcel, M.; Constantin, C.; Caruntu, C.; Zurac, S.; Neagu, M. Inflammatory Cytokine Pattern Is Sex-Dependent in Mouse Cutaneous Melanoma Experimental Model. *Journal of Immunology Research* **2017**, *2017*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/9212134>.
- (102) Almeida, M. C.; Santos, I. C.; Paschoalin, T.; Travassos, L. R.; Mauch, C.; Zigrino, P.; Pesquero, J. B.; Pesquero, J. L.; Higuchi, D. A. Leucurogin and Melanoma Therapy. *Toxicol* **2019**, *159*, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2018.12.005>.
- (103) Granato, L.; Longo, D.; Boutry, S.; Vander Elst, L.; Henoumont, C.; Aime, S.; Muller, R. N.; Laurent, S. Synthesis and Relaxometric Characterization of New Poly[*N*, *N*-bis(3-aminopropyl)Glycine] (PAPGly) Dendrons Gd-Based Contrast Agents and Their *in Vivo* Study by Using the Dynamic Contrast-Enhanced MRI Technique at Low Field (1 T). *Chemistry & Biodiversity* **2019**, *16* (11), e1900322. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900322>.
- (104) Wamba, B. E. N.; Ghosh, P.; Mbaveng, A. T.; Bhattacharya, S.; Debarpan, M.; Depanwita, S.; Saunak, M. M.; Kuete, V.; Murmu, N. Botanical from Piper Capense Fruit Can Help to Combat the Melanoma as Demonstrated by In Vitro and In Vivo Studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2021**, *2021*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2021/8810368>.
- (105) Sadhu, S. S.; Wang, S.; Dachineni, R.; Averineni, R. K.; Yang, Y.; Yin, H.; Bhat, G. J.; Guan, X. In Vitro and In Vivo Tumor Growth Inhibition by Glutathione Disulfide Liposomes. *Cancer Growth & Metastasis* **2017**, *10*, 117906441769607. <https://doi.org/10.1177/1179064417696070>.

- (106) Sun, S. H.; Angell, C. D.; Savardekar, H.; Sundi, D.; Abood, D.; Benner, B.; DiVincenzo, M. J.; Duggan, M.; Choueiry, F.; Mace, T.; Trikha, P.; Lapurga, G.; Johnson, C.; Carlson, E. J.; Chung, C.; Peterson, B. R.; Lianbo Yu; Zhao, J.; Kendra, K. L.; Carson, W. E. BTK Inhibition Potentiates Anti-PD-L1 Treatment in Murine Melanoma: Potential Role for MDSC Modulation in Immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **2023**, 72 (11), 3461–3474. <https://doi.org/10.1007/s00262-023-03497-1>.
- (107) Gao, W.; Wang, M.; Wang, L.; Lu, H.; Wu, S.; Dai, B.; Ou, Z.; Zhang, L.; Heymach, J. V.; Gold, K. A.; Minna, J.; Roth, J. A.; Hofstetter, W. L.; Swisher, S. G.; Fang, B. Selective Antitumor Activity of Ibrutinib in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **2014**, 106 (9). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju204>.
- (108) Dakup, P. P.; Porter, K. I.; Little, A. A.; Zhang, H.; Gaddameedhi, S. Sex Differences in the Association between Tumor Growth and T Cell Response in a Melanoma Mouse Model. *Cancer Immunol Immunother* **2020**, 69 (10), 2157–2162. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02643-3>.
- (109) Quintão, W. S. C.; Ferreira-Nunes, R.; Gratieri, T.; Cunha-Filho, M.; Gelfuso, G. M. Validation of a Simple Chromatographic Method for Naringenin Quantification in Skin Permeation Experiments. *Journal of Chromatography B* **2022**, 1201–1202, 123291. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123291>.
- (110) Mcnair, H.; Polite, L. N. 17 Troubleshooting in High Performance Liquid Chromatography. In *Separation Science and Technology*; Elsevier, 2007; Vol. 8, pp 459–477. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(07\)80023-7](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(07)80023-7).
- (111) Kazakevich, Y. V. Department of Chemistry and Biochemistry, Seton Hall University, South Orange, NJ 07079, USA.
- (112) Haun, J.; Teutenberg, T.; Schmidt, T. C. Influence of Temperature on Peak Shape and Solvent Compatibility: Implications for Two-Dimensional Liquid Chromatography: Liquid Chromatography. *J. Sep. Science* **2012**, 35 (14), 1723–1730. <https://doi.org/10.1002/jssc.201101092>.
- (113) Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **2006**.
- (114) Demurtas, A.; Pescina, S.; Nicoli, S.; Santi, P.; Ribeiro De Araujo, D.; Padula, C. Validation of a HPLC-UV Method for the Quantification of Budesonide in Skin Layers. *Journal of Chromatography B* **2021**, 1164, 122512. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122512>.
- (115) Duarah, S.; Sharma, M.; Wen, J. Rapid and Simultaneous Determination of Dexamethasone and Dexamethasone Sodium Phosphate Using HPLC-UV: Application in Microneedle-Assisted Skin Permeation and Deposition Studies. *Journal of Chromatography B* **2021**, 1170, 122609. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122609>.
- (116) Qidwai, A.; Khan, S.; Md, S.; Fazil, M.; Baboota, S.; Narang, J. K.; Ali, J. Nanostructured Lipid Carrier in Photodynamic Therapy for the Treatment of Basal-Cell Carcinoma. *Drug Delivery* **2016**, 23 (4), 1476–1485. <https://doi.org/10.3109/10717544.2016.1165310>.
- (117) Oliveira, P. M.; Alencar-Silva, T.; Pires, F. Q.; Cunha-Filho, M.; Gratieri, T.; Carvalho, J. L.; Gelfuso, G. M. Nanostructured Lipid Carriers Loaded with an Association of Minoxidil and Latanoprost for Targeted Topical Therapy of Alopecia. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2022**, 172, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.02.003>.
- (118) Iqubal, M. K.; Iqubal, A.; Imtiyaz, K.; Rizvi, M. M. A.; Gupta, M. M.; Ali, J.; Baboota, S. Combinatorial Lipid-Nanosystem for Dermal Delivery of 5-Fluorouracil and Resveratrol against Skin Cancer: Delineation of Improved Dermatokinetics and

- Epidermal Drug Deposition Enhancement Analysis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2021**, *163*, 223–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.04.007>.
- (119) Khurana, S.; Jain, N. K.; Bedi, P. M. S. Development and Characterization of a Novel Controlled Release Drug Delivery System Based on Nanostructured Lipid Carriers Gel for Meloxicam. *Life Sciences* **2013**, *93* (21), 763–772. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.09.027>.
- (120) Imran, M.; Iqbal, M. K.; Imtiyaz, K.; Saleem, S.; Mittal, S.; Rizvi, M. M. A.; Ali, J.; Baboota, S. Topical Nanostructured Lipid Carrier Gel of Quercetin and Resveratrol: Formulation, Optimization, in Vitro and Ex Vivo Study for the Treatment of Skin Cancer. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, *587*, 119705. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119705>.
- (121) Sathe, P.; Saka, R.; Kommineni, N.; Raza, K.; Khan, W. Dithranol-Loaded Nanostructured Lipid Carrier-Based Gel Ameliorate Psoriasis in Imiquimod-Induced Mice Psoriatic Plaque Model. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2019**, *45* (5), 826–838. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1576722>.
- (122) Hasan, N.; Imran, M.; Sheikh, A.; Tiwari, N.; Jaimini, A.; Kesharwani, P.; Jain, G. K.; Ahmad, F. J. Advanced Multifunctional Nano-Lipid Carrier Loaded Gel for Targeted Delivery of 5-Fluorouracil and Cannabidiol against Non-Melanoma Skin Cancer. *Environmental Research* **2023**, *233*, 116454. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116454>.
- (123) Czajkowska-Kośnik, A.; Szymańska, E.; Winnicka, K. Nanostructured Lipid Carriers (NLC)-Based Gel Formulations as Etodolac Delivery: From Gel Preparation to Permeation Study. *Molecules* **2022**, *28* (1), 235. <https://doi.org/10.3390/molecules28010235>.
- (124) Desfrancois, C.; Auzély, R.; Texier, I. Lipid Nanoparticles and Their Hydrogel Composites for Drug Delivery: A Review. *Pharmaceutics* **2018**, *11* (4), 118. <https://doi.org/10.3390/ph11040118>.
- (125) Khallaf, R. A.; Salem, H. F.; Abdelbary, A. 5-Fluorouracil Shell-Enriched Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Effective Skin Carcinoma Treatment. *Drug Delivery* **2016**, *23* (9), 3452–3460. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1194498>.
- (126) Pardeike, J.; Hommoss, A.; Müller, R. H. Lipid Nanoparticles (SLN, NLC) in Cosmetic and Pharmaceutical Dermal Products. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *366* (1–2), 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>.
- (127) Garg, N. K.; Tandel, N.; Bhadada, S. K.; Tyagi, R. K. Nanostructured Lipid Carrier-Mediated Transdermal Delivery of Aceclofenac Hydrogel Present an Effective Therapeutic Approach for Inflammatory Diseases. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 713616. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.713616>.
- (128) Feng, J.; Liu, D.; Wang, Z.; Li, C.; Huang, W.; Liu, S.; Li, Y. Interpenetrating Network Hydrogels Loaded with Nanostructured Lipid Carriers for Curcumin Delivery: Impact of Dual Crosslinking with Genipin and Calcium Ions. *Food Research International* **2025**, *202*, 115704. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.115704>.
- (129) Bhosale, A.; Jyothi, V. G. S. S.; Devangan, P.; Bajad, G.; Singh, H.; Patra, B.; Guru, S. K.; Madan, J. Emu Oil Enriched Nanostructured Lipid Carriers of Lornoxicam Burdened Polymeric Gel Augmented Drug Delivery and Assisted Cartilage Repairing in Knee Osteoarthritis: In-Vitro and in-Vivo Studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2024**, *98*, 105914. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105914>.
- (130) Nguyen, H. X.; Puri, A.; Banga, A. K. Methods to Simulate Rubbing of Topical Formulation for in Vitro Skin Permeation Studies. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *519* (1–2), 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.007>.

- (131) Salas, T.; Bordes, C.; Arquier, D.; Caillier, L.; Mandica, F.; Bolzinger, M.-A. Effect of Massage on Retinol Skin Penetration. *International Journal of Pharmaceutics* **2023**, *642*, 123106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123106>.
- (132) PerkinElmer. SOFTWARE MANUAL FOR USE WITH IVIS® SPECTRUM, 2014. [www.PerkinElmer.com](http://www.PerkinElmer.com).
- (133) Lins, F. V.; Bispo, E. C. I.; Rodrigues, N. S.; Silva, M. V. S.; Carvalho, J. L.; Gelfuso, G. M.; Saldanha-Araujo, F. Ibrutinib Modulates Proliferation, Migration, Mitochondrial Homeostasis, and Apoptosis in Melanoma Cells. *Biomedicines* **2024**, *12* (5), 1012. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12051012>.
- (134) Chen, J.; Kinoshita, T.; Sukbuntherng, J.; Chang, B. Y.; Elias, L. Ibrutinib Inhibits ERBB Receptor Tyrosine Kinases and HER2-Amplified Breast Cancer Cell Growth. *Molecular Cancer Therapeutics* **2016**, *15* (12), 2835–2844. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0923>.
- (135) Sagiv-Barfi, I.; Kohrt, H. E. K.; Czerwinski, D. K.; Ng, P. P.; Chang, B. Y.; Levy, R. Therapeutic Antitumor Immunity by Checkpoint Blockade Is Enhanced by Ibrutinib, an Inhibitor of Both BTK and ITK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112* (9). <https://doi.org/10.1073/pnas.1500712112>.
- (136) Rata, D. M.; Cadinoiu, A. N.; Atanase, L. I.; Popa, M.; Mihai, C.-T.; Solcan, C.; Ochiuz, L.; Vochita, G. Topical Formulations Containing Aptamer-Functionalized Nanocapsules Loaded with 5-Fluorouracil - An Innovative Concept for the Skin Cancer Therapy. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, *119*, 111591. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111591>.
- (137) Bose, C.; Singh, S. P.; Igid, H.; Green, W. C.; Singhal, S. S.; Lee, J.; Palade, P. T.; Rajan, A.; Ball, S.; Tonk, V.; Hindle, A.; Tarbox, M.; Awasthi, S. Topical 2'-Hydroxyflavone for Cutaneous Melanoma. *Cancers* **2019**, *11* (10), 1556. <https://doi.org/10.3390/cancers11101556>.
- (138) Tupal, A.; Sabzichi, M.; Ramezani, F.; Kouhsoltani, M.; Hamishehkar, H. Dermal Delivery of Doxorubicin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for the Treatment of Skin Cancer. *Journal of Microencapsulation* **2016**, *33* (4), 372–380. <https://doi.org/10.1080/02652048.2016.1200150>.
- (139) Roberts, M. S.; Cheruvu, H. S.; Mangion, S. E.; Alinaghi, A.; Benson, H. A. E.; Mohammed, Y.; Holmes, A.; Van Der Hoek, J.; Pastore, M.; Grice, J. E. Topical Drug Delivery: History, Percutaneous Absorption, and Product Development. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2021**, *177*, 113929. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113929>.

## ANEXO 1

### Declaração do Comitê de Ética no uso Animal (CEUA)



Universidade de Brasília

Comissão de Ética no Uso Animal


Brasília, 11 de outubro de 2024.

#### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “Avaliação de carreador lipídico nanoestruturado contendo ibrutinib para tratamento tópico do melanoma”, SEI nº 23106.053905/2024-85, sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) Laise Rodrigues de Andrade, (laise.andrade@unb.br), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Esse projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília na 219ª reunião ordinária, em 01/08/2024 para fins de PESQUISA e para utilização de *Mus musculus* (camundongo, c57BL/6, 54 indivíduos machos) provenientes do(a) Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR).

O presente certificado é válido pelo período de 11/10/2024 a 30/06/2025.



  
Dr. Bruno Stéfano Lima Dallago  
Coordenador da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## ANEXO 2

### Depósito de patente



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 021554 8

#### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00038174000143

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: CENTRO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO -  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY  
RIBEIRO, EDIFÍCIO CDT, ASA NORTE

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 70904-970

País: Brasil

Telefone: (61)3107-4100/4137

Fax:

Email: nupitec@cdt.unb.br






## ANEXO 3

### Artigos publicados



*Article*

# Development and Validation of a Chromatographic Method for Ibrutinib Determination in Human and Porcine Skin

Lucas E. F. Albuquerque <sup>1</sup>, Maria Victoria Souto <sup>2</sup>, Felipe Saldanha-Araujo <sup>3</sup>, Juliana Lott Carvalho <sup>2</sup>,  
Tais Gratieri <sup>1</sup>, Marcilio Cunha-Filho <sup>1</sup> and Guilherme M. Gelfuso <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, DF, Brazil

<sup>2</sup> School of Medicine, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, DF, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Hematology and Stem Cells (LHCT), School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, DF, Brazil; felipearaujo@unb.br

\* Correspondence: gmelfuso@unb.br



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

## Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/colsurfb](http://www.elsevier.com/locate/colsurfb)



### Ibrutinib topical delivery for melanoma treatment: The effect of nanostructured lipid carriers' composition on the controlled drug skin deposition

Lucas F.F. Albuquerque<sup>a</sup>, Fernanda V. Lins<sup>b,c</sup>, Elizabete C.I. Bispo<sup>b</sup>, Ellyêssa N. Borges<sup>d</sup>, Mateus T. Silva<sup>a</sup>, Taís Gratieri<sup>a</sup>, Marcílio Cunha-Filho<sup>a</sup>, Antonio Alonso<sup>d</sup>, Juliana L. Carvalho<sup>e</sup>, Felipe Saldanha-Araujo<sup>b</sup>, Guilherme M. Gelfuso<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF 70910-900, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Hematology and Stem Cells (LHCT), School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF 70910-900, Brazil

<sup>c</sup> Children's Medical Center Research Institute, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

<sup>d</sup> Institute of Mathematics and Physics, Federal University of Goiás, Goiânia, GO 74690-900, Brazil







<sup>e</sup> Multidisciplinary Laboratory of Biosciences, School of Medicine, University of Brasilia, Brasilia, DF 70910-900, Brazil





Article

## Toxicity and Dermatokinetic Analysis of Ibrutinib in Human Skin Models

Maria Victória Souto-Silva <sup>1</sup>, Elizabete C. I. Bispo <sup>2</sup>, Lucas F. E. Albuquerque <sup>3</sup>, Stefhani Barcelos <sup>1</sup>, Emānuella M. Garcez <sup>1</sup>, Luana S. Quilici <sup>1</sup>, Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto <sup>4</sup>, Eliza Carla Barroso Duarte <sup>5</sup>, Jankerle N. Boeloni <sup>6</sup>, Felipe Saldanha-Araujo <sup>2</sup>, Guilherme M. Gelfuso <sup>3</sup> and Juliana Lott Carvalho <sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Interdisciplinary Biosciences Laboratory, Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brasília 70910-900, DF, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Hematology and Stem Cells, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasília 70910-900, DF, Brazil; felipearaujo@unb.br (F.S.-A.)

<sup>3</sup> Laboratory of Food, Drugs and Cosmetics (LTMAC), Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasília 70910-900, DF, Brazil; gmgelfuso@unb.br (G.M.G.)

<sup>4</sup> Catholic University of Brasilia, Brasília 71966-900, DF, Brazil

<sup>5</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, DF, Brazil

<sup>6</sup> Center for Agricultural Sciences and Engineering, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Espírito Santo, Alegre 29500-000, ES, Brazil

\* Correspondence: julianalott@gmail.com

## ANEXO 4

Capítulo de livro publicado

### CHAPTER 1

---

# Nanocarriers for Skin Cancer Topical Treatment

LUCAS F. ALBUQUERQUE, CAMILA O. CARDOSO,  
MARCÍLIO CUNHA FILHO, TAÍS GRATIERI, and  
GUILHERME M. GELFUSO

*Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), University of Brasilia,  
Brasilia, DF, Brazil*

---

