



Universidade de Aveiro

Ano 2021

**Cristiana Sofia  
Neves Gonçalves**

**Sistemas de microagulhas para o tratamento não  
invasivo de cancro da pele**



Universidade de Aveiro  
Ano 2021

**Cristiana Sofia  
Neves Gonçalves**

**Sistemas de microagulhas para o tratamento não  
invasivo de cancro da pele**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire, Investigadora Principal com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Carla Andreia Cunha Vilela, Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais e avós pelo incansável apoio.

## **o júri**

Presidente

**Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

**Doutora Bárbara Joana Martins Leite Ferreira**  
Investigadora Doutorada da Universidade de Aveiro

**Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire**  
Investigadora Principal com Agregação da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras, à Doutora Carmen Freire e à Doutora Carla Vilela, por todo o apoio, disponibilidade, paciência, orientação e críticas construtivas dadas ao longo da realização desta dissertação de mestrado.

À Bárbara Pereira e ao João Carvalho, agradeço imenso por se disponibilizarem a ajudar-me sempre no laboratório e a responder a todas as minhas dúvidas ao longo de todo o meu percurso.

Ao Doutor Ricardo Pinto, quero agradecer a ajuda inicial na preparação das nanopartículas de ouro.

Gostaria de agradecer também à Doutora Verónica Bastos e à Doutora Helena Oliveira pela realização dos ensaios de viabilidade celular.

Aos meus pais e avós, quero agradecer o amor, a paciência, o apoio incondicional e todos os sacrifícios que fizeram por mim, não só nestes últimos cinco anos, mas em toda a minha vida.

Aos meus amigos, os de infância e a todos os que conheci nesta cidade que tem agora um lugar especial no meu coração, o meu muito obrigado por toda a amizade e apoio em todos os momentos.

Por fim, quero agradecer também a todos os professores pelo conhecimento transmitido ao longo do meu percurso académico.

A todos, o meu mais sincero obrigado!

## palavras-chave

Microagulhas, pululano, nanopartículas de ouro, fucoidano, melanoma

## Resumo

O melanoma é a forma mais grave de cancro da pele, existindo atualmente diversos tipos de tratamentos possíveis para este tipo de cancro. Entre eles, destacam-se a cirurgia, a quimioterapia, a imunoterapia, a radioterapia e as terapias alvo. Muitas das propriedades farmacológicas dos fármacos convencionais podem ser melhoradas através do uso de sistemas de administração de fármacos adequados. Desde que a primeira patente de microagulhas foi registada, a investigação sobre a utilização de microagulhas como sistema de administração de fármacos avançou significativamente, existindo um interesse crescente em usar estes dispositivos para tratar diferentes condições dermatológicas, como é o caso dos melanomas.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho consistiu na preparação e caracterização de microagulhas de pululano contendo nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com fucoidano, que é um polissacarídeo com propriedades antitumorais, e estudar a sua potencial aplicação para o tratamento não invasivo de cancro da pele. Os sistemas de microagulhas preparados foram caracterizados relativamente à sua morfologia, propriedades mecânicas, capacidade de inserção na pele e citotoxicidade *in vitro*.

Os resultados mostram que as microagulhas com melhores características morfológicas (por se apresentarem completamente preenchidas) e mecânicas (0,42 N por microagulha) são as que foram preparadas a partir de uma solução com 20% m/v de pululano. Posteriormente, foram testadas diferentes concentrações de fucoidano para avaliar o seu efeito no tamanho e concentração das AuNPs e, concluiu-se que a solução de 0,1% m/v de fucoidano permite a obtenção de nanopartículas de menor tamanho, tendo sido, por isso, escolhida para a produção das AuNPs. A incorporação das AuNPs nas microagulhas de pululano alterou o seu aspeto morfológico, tornando-as ocas, e diminuiu a sua resistência mecânica (0,22 N por microagulha). No entanto, e de acordo com o teste de inserção num modelo físico de pele, as microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano conseguem penetrar até 381  $\mu\text{m}$  de profundidade, o que demonstra que têm capacidade para ultrapassar o estrato córneo. Adicionalmente, a citotoxicidade *in vitro* das microagulhas foi avaliada nas linhas celulares HaCaT (queratinócitos humanos) e A375 (células de melanoma humano) ao fim de 24 h. Os resultados mostraram que as microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano não são citotóxicas para as células HaCaT (viabilidade celular  $\approx 100\%$ ), no entanto, a viabilidade celular das células A375 reduziu para  $74,3 \pm 2,5\%$ . Esta redução é indicativa de que as microagulhas possuem alguma toxicidade celular para as células de melanoma, e, portanto, um aumento da concentração das AuNPs/fucoidano promoverá certamente uma maior resposta citotóxica nas células cancerígenas. Todos os resultados alcançados demonstram o potencial destes sistemas de microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano para o tratamento não invasivo de cancro da pele.

## keywords

Microneedles, pullulan, gold nanoparticles, fucoidan, melanoma

## abstract

Melanoma is the most serious form of skin cancer, and currently there are several types of possible treatments for this type of cancer. These include surgery, chemotherapy, immunotherapy, radiotherapy, and targeted therapies. Many of the pharmacological properties of conventional drugs can be improved by using drug delivery systems. Since the first microneedle patent was registered, research into the use of microneedles as a drug delivery system has advanced significantly, and there is a growing interest in using these devices to treat dermatological conditions, such as melanomas.

In this context, the main objective of this study is the preparation and characterization of pullulan microneedles incorporated with gold nanoparticles (AuNPs), functionalized with fucoidan, which is a polysaccharide with anticancer properties, and study their application for the non-invasive treatment of skin cancer. The microneedle systems prepared were characterized in terms of morphology, mechanical properties, skin insertion capacity and *in vitro* cytotoxicity.

The results show that the microneedles with better morphological (because they are completely filled) and mechanical performance (0,42 N per microneedle) are those prepared from a solution with 20% w/v of pullulan. Afterwards, different fucoidan concentrations were tested to check their effect on the size and concentration of AuNPs and it was concluded that the solution with 0.1% w/v of fucoidan allows the formation of smaller nanoparticles and, therefore, has been chosen for the synthesis of AuNPs. The incorporation of AuNPs into the microneedles modified their morphological appearance, making them hollow, and decreased their mechanical resistance (0,22 N per microneedle). Nevertheless, it was possible to conclude that the microneedles can penetrate up to 381  $\mu\text{m}$  depth, managing to overcome the *stratum corneum*. Additionally, the *in vitro* cytotoxicity of the microneedles was evaluated in the HaCaT (human keratinocytes) and A375 (human melanoma) cell lines after 24 h. The results showed that the pullulan/AuNPs/fucoidan microneedles are not cytotoxic to HaCaT cells (cell viability  $\approx$  100%), however, the cell viability of A375 cells decreased to  $74.3 \pm 2.5\%$ . This reduction is indicative that the microneedles have some cellular toxicity for melanoma cells, and therefore an increase in the concentration of AuNPs/fucoidan will certainly promote a greater cytotoxic response in cancer cells. All the achieved results demonstrate the potential of these pullulan/AuNPs/fucoidan microneedle systems for the non-invasive treatment of skin cancer.

# Índice

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ENQUADRAMENTO</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1. Melanomas .....	11
1.1.1. Causas e fatores de risco .....	11
1.1.2. Diferentes tipos de melanomas .....	13
1.1.3. Tratamentos .....	14
1.2. Sistemas de administração de fármacos .....	17
1.2.1. Administração transdérmica de fármacos .....	17
1.3. Microagulhas.....	21
1.3.1. Tipos de microagulhas .....	23
1.3.2. Estratégias de administração de fármacos usando microagulhas .....	25
1.3.3. Aplicações .....	27
1.4. Microagulhas biopoliméricas.....	30
1.4.1. Microagulhas biopoliméricas solúveis .....	30
1.4.2. Microagulhas biopoliméricas biodegradáveis .....	31
1.4.3. Microagulhas biopoliméricas intumescíveis .....	31
1.4.4. Fabrico de microagulhas biopoliméricas .....	31
1.4.5. Microagulhas biopoliméricas no transporte transdérmico de fármacos.....	33
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
2.1. Reagentes, materiais e células.....	35
2.2. Preparação das microagulhas de pululano .....	35
2.3. Síntese de nanopartículas de ouro funcionalizadas com fucoidano .....	36
2.4. Preparação das microagulhas de pululano contendo AuNPs/fucoidano .....	36
2.5. Caracterização das amostras .....	37
2.5.1. Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis) .....	37
2.5.2. Espectrometria de plasma acoplado indutivamente (ICP) .....	37
2.5.3. Dispersão dinâmica de luz (DLS).....	37
2.5.4. Análise morfológica das microagulhas .....	37
2.5.5. Análise mecânica das microagulhas .....	37

2.5.6. Teste de inserção em parafilme .....	38
2.6. Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	38
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
3.1. Preparação e caracterização das microagulhas de pululano .....	40
3.2. Síntese e caracterização das AuNPs funcionalizadas com fucoïdano .....	43
3.3. Preparação e caracterização das microagulhas de pululano/AuNPs/ fucoïdano...	45
3.3.1. Análise morfológica.....	45
3.3.2. Análise mecânica .....	46
3.3.3. Inserção no modelo de parafilme .....	48
3.3.4. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	49
<b>4. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO .....</b>	<b>51</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>53</b>

## Abreviaturas

5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
5-FU	5-Fluorouracil
AINEs	Anti-inflamatórios Não-Esteroides
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
BRAF	Fator Associado a BRCA2, do inglês “ <i>BRCA2 associated factor</i> ”
CMC	Carboximetilcelulose
CTLA4	Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos, do inglês “ <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4</i> ”
DDS	Sistemas de Transporte de Fármacos, do inglês “ <i>Drug Delivery systems</i> ”
DLS	Dispersão Dinâmica de Luz (do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulócitos-Monócitos
HA	Ácido Hialurônico
HAuCl <sub>4</sub>	Hidrogenotetracloroeto de ouro III
HPMC	Hidroximetilpropilcelulose
ICP	Espectrometria de plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma</i> )
IL-2	Interleucina 2
LAKs	Células Assassinas Ativadas por Linfocina, do inglês “ <i>Lymphokine-activates killer cell</i> ”
MEK	Proteína quinase quinase ativada por mitogénios, do inglês “ <i>Mitogen-activated protein Kinase Kinase</i> ”
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio
NPs	Nanopartículas
PD1	Proteína Programada 1 de Morte Celular, do inglês “ <i>Programmed cell Death protein 1</i> ”
PDL1	Ligando 1 de morte programado, do inglês “ <i>Programmed cell Death Ligand 1</i> ”

PDMS	Polidimetilsiloxano
PGA	Ácido poliglicólico
PLLA	Ácido poli(L-lático)
PMMA	Poli(metacrilato de metilo)
PS	Poliestireno
PVA	Ácido polivinílico
RNA	Ácido Ribonucleico
TILs	Linfócitos Infiltrantes de Tumores
UV	Radiação Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Tipos de melanomas: (A) Melanoma extensivo superficial. <sup>30</sup> ; (B) Melanoma nodular. <sup>33</sup> ; (C) Melanoma lentigo maligno. <sup>33</sup> ; (D) Melanoma acral lentiginoso. <sup>37</sup> .....	14
<b>Figura 2.</b> Representação de diferentes tipos de sistemas transdérmicos de libertação de fármacos: (A) Adesivo do tipo reservatório; (B, C) Adesivos do tipo matriz; (D) Fármaco incorporado no adesivo. <sup>52</sup> .....	18
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática das diferentes camadas da pele. <sup>54</sup> .....	19
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação de um dispositivo de microagulhas. <sup>3</sup> .....	21
<b>Figura 5.</b> (A) Microagulhas no plano; (B) Microagulhas fora do plano; (C) Microagulhas ocas; (D) Microagulhas sólidas. <sup>4</sup> .....	24
<b>Figura 6.</b> Formas de microagulhas. (a) Cilíndrica; (b) Ponta cônica; (c) Cônica; (d) Piramidal. <sup>4</sup> .....	24
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática de estratégias de administração de fármacos usando microagulhas. (A) “poke with patch” usando microagulhas sólidas; (B) “coat and poke” usando microagulhas revestidas; (C) “poke and release” usando microagulhas solúveis; (D) “poke and flow” usando microagulhas ocas; (E) e microagulhas de hidrogéis. <sup>69</sup> .....	26
<b>Figura 8.</b> Micrografias de amostras de microagulhas revestidas com 5-ALA obtidas usando (A) um estereomicroscópio de campo claro e (B) um microscópio eletrônico de varrimento. Micrografia eletrônica de varrimento de microagulhas revestidas com 5-ALA: (C, D) antes da inserção e (E, F) após inserção por 5 min na pele suína <i>in vitro</i> . <sup>92</sup> .....	29
<b>Figura 9.</b> Esquema do processo de fabrico de microagulhas poliméricas por micromoldagem com um molde de polidimetilsiloxano (PDMS). <sup>5</sup> .....	32
<b>Figura 10.</b> Fotografia digital do molde de PDMS utilizado para preparar as microagulhas de pululano. ....	36
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática da preparação do sistema de microagulhas solúveis de pululano e nanopartículas de ouro funcionalizadas com fucoidano. ....	40
<b>Figura 12.</b> Fotografias dos sistemas de microagulhas obtidas na lupa para as diferentes concentrações de pululano: (A) 10% pululano e (B) 20% pululano.....	41
<b>Figura 13.</b> Gráfico da força por agulha (N) em função da distância (mm) para as diferentes concentrações de pululano (10% e 20% m/v). ....	42

<b>Figura 14.</b> (A) Fotografias digitais das soluções coloidais das AuNPs preparadas com diferentes concentrações de fucoidano (0,1 e 0,05%, m/v) e (B) espectros de UV-vis das AuNPs funcionalizadas com fucoidano para a concentração de 0,1 % m/v. ....	44
<b>Figura 15.</b> Análise de DLS da distribuição de tamanhos das nanopartículas de ouro (AuNPs) sintetizadas com 0,1 e 0,05% (m/v) de fucoidano. ....	44
<b>Figura 16.</b> Fotografias digitais das microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano obtidas na lupa. ....	46
<b>Figura 17.</b> Gráfico da força por agulha (N) em função da distância (mm) para as microagulhas de pululano (20%, m/v) e para as microagulhas de pululano funcionalizadas com AuNPs/fucoidano. ....	47
<b>Figura 18.</b> Fotografias dos sistemas de microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano obtidas no microscópio ótico (ampliação: 25×) após a realização do teste mecânico de compressão. ....	47
<b>Figura 19.</b> (A) Esquema da inserção das microagulhas nas das 8 camadas de parafilme, e (B) micrografias óticas (ampliação: 25×) da 1 <sup>a</sup> e 3 <sup>a</sup> camadas de parafilme após os testes de inserção das microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano.....	48
<b>Figura 20.</b> Esquema reacional da transformação do MTT em formazano (ISO 10993-5:2009(E)). ....	49
<b>Figura 21.</b> Viabilidade celular (%) das células HaCaT e A375 quando expostas às amostras de microagulhas de pululano e pululano/AuNPs/fucoidano durante 24 h.....	50

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Categorias de microagulhas.....	23
--	----

## Enquadramento

Nas últimas décadas, o interesse no desenvolvimento de alternativas mais eficazes que permitem a administração de fármacos, com um reduzido impacto sobre os tecidos e órgãos saudáveis, tem aumentado consideravelmente.<sup>1</sup> A pele é um órgão através do qual é possível administrar várias formulações via administração transdérmica. Através desta via é possível administrar substâncias ativas e direcioná-las para os alvos em que deverão exercer o seu efeito farmacológico. A administração transdérmica é considerada uma boa alternativa a outras vias de administração, como a injeção com agulhas hipodérmicas, uma vez que resolve algumas das suas maiores desvantagens, sendo indolor, não invasiva e evitando o metabolismo de primeira passagem.<sup>1</sup> Contudo, a administração transdérmica apresenta algumas dificuldades, entre as quais a administração de uma dose suficiente de fármacos através da pele, devido às propriedades de barreira do estrato córneo que atua como uma barreira impermeável aos fármacos hidrofílicos ou de elevado peso molecular.<sup>2</sup>

Neste contexto, surgem as microagulhas, que são dispositivos micrométricos capazes de penetrar a barreira do estrato córneo.<sup>3</sup> As microagulhas podem ser produzidas com diversos materiais, nomeadamente metais, vidro e vários polímeros sintéticos ou naturais.<sup>4</sup> Atualmente, os biopolímeros têm sido bastante utilizados para fabricar microagulhas porque reduzem os perigos associados à quebra das microagulhas na pele e ainda os procedimentos complexos e dispendiosos que são necessários para o fabrico das microagulhas com outros materiais.<sup>5</sup> As características mais relevantes dos biopolímeros são a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e natureza não tóxica.<sup>6</sup>

O pululano é um polímero natural produzido pelo fungo *Aureobasidium pullulans*.<sup>7</sup> É um polissacarídeo linear hidrofílico constituído principalmente por unidades de maltotriose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,6), com capacidade para formar filmes mecanicamente fortes, transparentes, solúveis em água e com baixa permeabilidade a óleos e ao oxigénio. Para além disso, não apresenta toxicidade ou mutagenicidade.<sup>8</sup> Devido a estas características peculiares, o pululano e os seus derivados desempenham um papel importante em inúmeras aplicações biomédicas, como engenharia de tecidos, vacinação e entrega direcionada de fármacos e genes.<sup>9</sup> O uso de pululano tem captado especial interesse no desenvolvimento de materiais de base biológica, tendo-se obtido recentemente resultados promissores relativamente à sua utilização na fabricação de sistemas microagulhas.<sup>10,11</sup>

As nanopartículas (NPs) metálicas são uma classe de nanomateriais que também apresentam diversas aplicações biomédicas, como por exemplo na terapia do cancro e imagiologia de tumores.<sup>12,13</sup> De facto, a síntese de NPs de metais nobres, como o ouro (Au), a prata (Ag) e a platina (Pt), ganhou uma enorme atenção nas últimas décadas.<sup>14</sup> De entre as NPs de metais nobres, destacam-se as nanopartículas de ouro (AuNPs) devido à sua versatilidade sintética, que permite um ajuste preciso do tamanho das partículas, da sua forma, das suas propriedades da superfície consoante a aplicação desejada, e das propriedades óticas e eletrónicas.<sup>15</sup> As AuNPs têm sido exploradas numa ampla variedade de aplicações biomédicas, nomeadamente em imagiologia e entrega direcionada de fármacos ou genes, bem como no desenvolvimento de plataformas de diagnóstico.<sup>16,17,18</sup>

A síntese de AuNPs usando biomacromoléculas, por exemplo, o alginato de sódio, amido, celulose, quitosano, gelatina, colagénio, fucoidano, entre outros, como agentes redutores e estabilizadores é uma estratégia bem documentada, que supera os efeitos ambientais das metodologias convencionais que geralmente envolvem o uso de agentes redutores nocivos, como a hidrazina.<sup>19</sup> O fucoidano é um polissacarídeo natural sulfatado que existe principalmente na parede celular de várias espécies de algas castanhas, e que apresenta várias propriedades biológicas, incluindo propriedades anti-angiogénicas, anti-tumorais e anti-inflamatórias.<sup>20</sup> O fucoidano pode ter como alvo as principais moléculas apoptóticas envolvidas na progressão do cancro, podendo danificar seletivamente as células cancerígenas e superar a toxicidade sistémica em células saudáveis durante a quimioterapia e a radioterapia.<sup>21</sup> Adicionalmente, este polissacarídeo pode também induzir a mobilização de células estaminais e o stresse oxidativo.<sup>22</sup> Alguns dos fatores que afetam a atividade antitumoral do fucoidano são, por exemplo, a espécie das algas castanhas das quais é extraído, o seu conteúdo em grupos sulfatos e o seu peso molecular.<sup>20</sup>

Neste contexto, o objetivo principal desta dissertação consiste na preparação e caracterização de microagulhas de pululano contendo AuNPs funcionalizadas com fucoidano, para potencial aplicação no tratamento não invasivo de cancro da pele. Por conseguinte, a presente dissertação está organizada em quatro capítulos, nomeadamente uma introdução bibliográfica (capítulo 1), os materiais e métodos (capítulo 2), os resultados e discussão (capítulo 3), e as conclusões (capítulo 4). Na introdução bibliográfica faz-se uma breve descrição das causas, fatores de risco, tipos e tratamentos de melanomas, bem como uma revisão dos sistemas de administração de fármacos, tipos e aplicações de microagulhas, e microagulhas biopoliméricas. Os materiais e métodos

são descritos no capítulo seguinte, onde se incluem as metodologias de preparação das microagulhas de pululano e nanopartículas de ouro, e os métodos utilizados para a respetiva caracterização morfológica, mecânica e avaliação da citotoxicidade *in vitro*. No capítulo 3 são apresentados e discutidos os resultados obtidos na preparação e caracterização das microagulhas de pululano contendo AuNPs funcionalizadas com fucoidano. E por fim, no último capítulo são indicadas as principais conclusões do trabalho realizado bem como algumas propostas para trabalho futuro.

# 1. Introdução

## 1.1. Melanomas

O melanoma é a forma mais grave de cancro da pele, tendo início em células conhecidas como melanócitos.<sup>23</sup> Estas células são responsáveis pela pigmentação da pele e do cabelo, contribuindo, assim, para a sua aparência e fornecendo proteção contra os danos causados pela radiação ultravioleta (UV).<sup>24</sup> Um melanoma desenvolve-se como resultado da acumulação de anomalias nas vias genéticas do melanócito, que dão lugar a um aumento da proliferação celular e que evitam as vias normais de apoptose em resposta a danos no DNA (ácido desoxirribonucleico). Adicionalmente, esses danos resultam na seleção de mutações genéticas que permitem todas as formas do fenótipo maligno, incluindo a estimulação do crescimento dos vasos sanguíneos, a evasão da resposta imune, a invasão tumoral e metástases.<sup>25</sup> Os melanomas cutâneos são muito mais perigosos que outros tipos de cancro devido à sua capacidade de metastizar e se espalhar rapidamente para outros órgãos.<sup>23</sup>

### 1.1.1. Causas e fatores de risco

Entre as principais causas e fatores de risco do aparecimento de melanomas podemos enumerar a exposição à radiação UV, o sistema imunitário enfraquecido, ter fenótipo de pele clara, sinais ou marcas de nascença, sardas, um histórico familiar com casos de melanoma e a profissão.<sup>26</sup>

A exposição excessiva à radiação UV desempenha um papel primordial no desenvolvimento de melanomas, uma vez que esta provoca danos no DNA e aumenta o risco de mutação.<sup>27</sup> A exposição intermitente ao sol refere-se a períodos curtos e intensos de exposição, já a exposição crónica é contínua e com menos intensidade. Pessoas com exposição crónica ao sol possuem uma adaptação superior aos raios UV e, portanto, têm menos probabilidade de serem prejudicados por eles.<sup>27</sup> A exposição à radiação UV emitida pelas máquinas de bronzamento artificial é cancerígena, uma vez que emitem raios UVA e UVB com uma intensidade 2 a 4 vezes mais elevada que o sol no seu pico de emissão UV no Verão. Quanto maior for a utilização destes métodos de bronzamento artificial, maior a probabilidade de desenvolver melanomas no futuro.<sup>26</sup>

Possuir o sistema imunitário enfraquecido como resultado de tratamentos médicos, como quimioterapia ou terapia imunossupressora, ou como consequência de doenças como linfomas ou vírus da imunodeficiência humana (VIH) também elevam o risco de desenvolvimento de melanomas.<sup>26</sup>

Está também cientificamente comprovado que indivíduos de pele clara têm um risco aumentado, em comparação com indivíduos com pele mais escura, de desenvolver este tipo de cancro. Características fenotípicas como olhos claros e cabelos claros ou ruivos são também fatores conhecidos por aumentar esse mesmo risco.<sup>28</sup>

As sardas são manchas de pele pigmentadas que aparecem com uma elevada exposição ao sol e comumente em indivíduos de pele clara, sendo que o aumento da quantidade de sardas está igualmente associado a maiores riscos de aparecimento de melanomas.<sup>26</sup> As marcas de nascença (coleções benignas de melanócitos que podem ser congénitas ou adquiridas) não são perigosas, no entanto, pessoas com muitos sinais/marcas de nascença apresentam um maior risco de desenvolver melanomas.<sup>29</sup> Pensa-se que os melanócitos dentro de um nevo podem ter uma maior probabilidade de sofrer uma transformação maligna, no entanto, o desenvolvimento de um melanoma num sinal existente é raro, uma vez que a maioria se desenvolve na pele normal.<sup>26</sup>

O histórico familiar é definido como um dos principais fatores de risco no que diz respeito ao desenvolvimento de melanomas. Indivíduos com um parente de 1º grau com melanoma têm um risco duas vezes superior de desenvolver um melanoma em comparação com os que não têm histórico familiar. Esta avaliação pode tornar-se um pouco complexa, porque os membros da família diagnosticados com melanoma podem ter adquirido o tumor devido à suscetibilidade genética, a exposições comuns, ou possivelmente a ambos.<sup>30</sup>

A radiação cósmica e UV recebida, em grandes altitudes, pelos pilotos e comissários de bordo, também tem sido frequentemente associada ao aumento do risco de melanoma.<sup>31</sup> No entanto, o estilo de vida destes trabalhadores pode confundir esta associação, uma vez que outros fatores de risco, como os referidos anteriormente, podem ser causadores do melanoma desenvolvido por estes indivíduos.

### **1.1.2. Diferentes tipos de melanomas**

O melanoma pode ser classificado em quatro subtipos, nomeadamente, melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno e melanoma acral lentiginoso (Figura 1).<sup>32</sup>

#### ***Melanoma extensivo superficial***

Este é o tipo mais comum de melanoma.<sup>26</sup> Geralmente aparece como uma lesão plana, com extremos irregulares e variações de cor (Figura 1A). Estas lesões aparecem com mais frequência no tronco dos homens, nas pernas das mulheres e na parte superior das costas em ambos os sexos. Pode ocorrer num sinal preexistente ou numa nova lesão. Quando ocorre num sinal já existente na pele, tende a crescer superficialmente durante algum tempo antes de penetrar para camadas mais profundas da pele. As lesões podem ser planas ou ligeiramente elevadas, com formas irregulares que podem ser castanhas, cinzentas, pretas, azuis, cor de rosa ou brancas.<sup>33</sup>

#### ***Melanoma nodular***

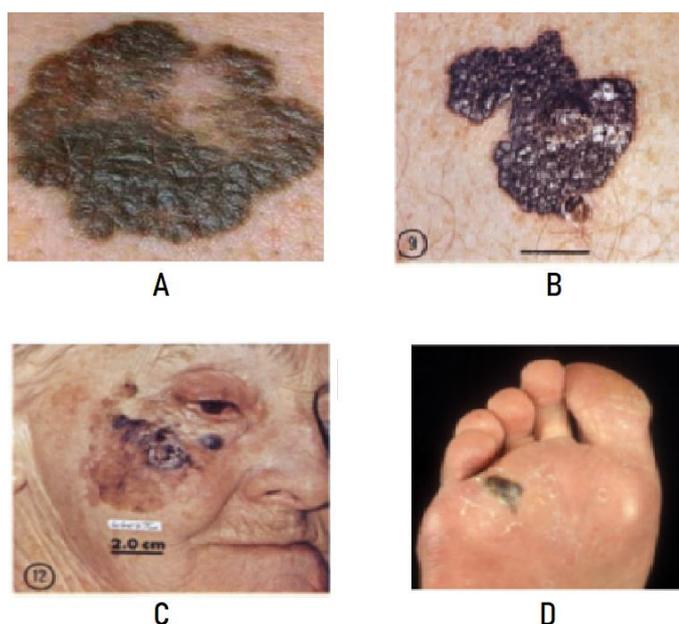
Esta tipologia de melanoma é invasiva, de rápido crescimento e é encontrado principalmente no tronco, cabeça ou pescoço. É mais frequente em homens do que em mulheres e, ao contrário dos outros tipos de melanomas, só consegue ser diagnosticado numa fase bastante avançada, tendo, por isso, a si associado um fraco prognóstico. O melanoma nodular aparece como um nódulo azul escuro ou preto, em forma de cúpula (Figura 1B).<sup>34</sup>

#### ***Melanoma lentigo maligno***

Este melanoma tem início normalmente numa marca de nascença preexistente, ocorrendo mais frequentemente em pessoas com idades mais avançadas, normalmente na face e outras áreas cronicamente expostas ao sol.<sup>35</sup> Ao contrário do melanoma nodular, que tem uma taxa bastante estável de ocorrências, a taxa de melanoma lentigo maligno tem aumentado continuamente nas últimas décadas, devido à exposição crónica ao sol. Este tipo de melanoma é normalmente grande, plano, com diferentes tons de castanho, ou preto, azul, vermelho, cinza ou branco (Figura 1C).<sup>36</sup>

### ***Melanoma acral lentiginoso***

O termo “acral” vem do grego “akron” que significa extremidade, o que indica que este tipo de melanoma aparece normalmente nas palmas das mãos, plantas dos pés ou sob as unhas, representando o tipo menos comum de melanoma.<sup>37</sup> Contudo, é o melanoma mais comum em afroamericanos e asiáticos. As lesões aparecem como hematomas que podem ser de cor bege, castanho ou preto, com bordas irregulares (Figura 1D).<sup>38,39</sup>



**Figura 1.** Tipos de melanomas: (A) Melanoma extensivo superficial.<sup>30</sup>; (B) Melanoma nodular.<sup>33</sup>; (C) Melanoma lentigo maligno.<sup>33</sup>; (D) Melanoma acral lentiginoso.<sup>37</sup>

#### **1.1.3. Tratamentos**

Atualmente, existem diversos tipos de tratamentos possíveis para melanomas. Entre eles, encontramos a cirurgia, a quimioterapia, a imunoterapia, a radioterapia e as terapias alvo.<sup>40</sup>

#### **Cirurgia**

Dentro da cirurgia temos a cirurgia de excisão e a dissecação do nódulo linfático. A cirurgia de excisão é a principal opção terapêutica para a maioria dos casos de melanoma.<sup>27,41</sup> Neste caso, o tumor é retirado juntamente com uma pequena porção de tecido saudável utilizando anestesia local.<sup>41</sup> Através deste procedimento, a maioria dos

melanomas em fase inicial são curados. Após a cirurgia, é necessário avaliar a necessidade de uma terapia complementar, ou seja, a toma de um fármaco com o objetivo de diminuir a probabilidade de o tumor reaparecer.<sup>42</sup> No caso da dissecação de nódulo linfático, o mapeamento do nódulo linfático e a biópsia são procedimentos realizados para verificar se o tumor se propagou para os gânglios linfáticos. Caso seja detectado um tumor nessas regiões, poderá proceder-se à sua remoção.<sup>40</sup>

## **Quimioterapia**

A quimioterapia é o tratamento mais antigo para melanomas avançados, e trata-se de uma abordagem utilizada para interromper o crescimento de tumores utilizando substâncias químicas que matam as células cancerígenas ou impedem a sua multiplicação.<sup>43</sup> As substâncias químicas utilizadas incluem agentes alquilantes (dacarbazina, temozolomida, nitrosoureias), análogos da platina e toxinas microtubulares. Estes agentes são utilizados isoladamente ou combinados e podem ser administrados oralmente, por via intravenosa ou arterial através dos músculos ou do abdômen.<sup>44</sup>

A quimioterapia ainda é muito utilizada, no entanto, como os novos tratamentos (terapias alvo e imunoterapias) tem apresentado melhores resultados, esta deixou de ser a melhor opção de tratamento nos casos de melanoma metastático. A resistência à apoptose é a principal causa que se pensa ser responsável pela resistência a fármacos em melanomas, ainda assim ela pode aliviar os sintomas ou aumentar o tempo de vida de alguns pacientes.<sup>43</sup>

## **Imunoterapia**

A imunoterapia utiliza compostos que estimulam o sistema imunológico do paciente a reconhecer e destruir as células cancerígenas. Este tipo de terapia é útil no tratamento de melanomas com alto risco de recorrência da doença e em casos de melanomas avançados.<sup>45</sup>

As intervenções imunoterapêuticas podem ser divididas em: (i) agentes biológicos, como as citocinas, incluindo inter-leucina-2 (IL-2), interferões e o fator estimulador de colônias granulócitos-monócitos (GM-CSF); (ii) estratégias de vacinação, tais como vacinas peptídicas, vacinas de proteína total, vacinas baseadas em vírus, vacinas de DNA e vacinas baseadas em células dendríticas; (iii) terapia celular adotiva com células assassinas ativadas por linfocinas (LAKs), linfócitos infiltrantes de tumores (TILs), células T específicas para melanoma periférico derivado de sangue e linfócitos T

modificadores de genes; e (iv) inibidores imunes de controlo, incluindo CTLA4 (antígeno associado a linfócitos T citotóxicos), anti-PD1 (do inglês “*programmed cell death protein 1*”) e anti-PDL1 (do inglês “*programmed cell death 1 ligand 1*”).

### **Radioterapia**

A radioterapia é raramente usada para tratar um melanoma no seu local original, mas pode ser usada para tratar melanomas que se espalharam para o cérebro, de modo a diminuir o tamanho de tumores e a dor.<sup>44</sup> Também é usada após cirurgia para remover o melanoma, para ajudar a garantir que todas as células tumorais são eliminadas, estando também a ser estudada em combinação com tratamentos como terapias de bloqueio de pontos de verificação para melhorar os resultados em pacientes com melanomas avançados.<sup>40</sup>

### **Terapias Alvo**

A terapia alvo é um tratamento que inibe componentes específicos que contribuem para o crescimento e sobrevivência das células tumorais do melanoma, prevenindo inclusive a destruição das células saudáveis.<sup>43</sup> Atualmente, a terapia alvo para melanomas inclui:

- **Inibidores BRAF (do inglês “*BRCA2 associated factor*”):** a descoberta de que aproximadamente 50% dos melanomas têm uma alteração no gene BRAF proporcionou uma revolução no seu tratamento. Os fármacos que atuam no funcionamento das proteínas codificadas por este gene são administrados por via oral e são especificamente utilizados quando existe uma mutação no gene BRAF. A utilização destes fármacos reduz significativamente a probabilidade de progressão da doença e melhora a qualidade de vida dos pacientes.
- **Combinação dos inibidores de BRAF e MEK (do inglês “*mitogen-activated protein kinase kinase*”):** este tratamento é indicado para pacientes com melanomas que não podem ser removidos cirurgicamente ou melanomas que possuem a mutação BRAF. A combinação destes fármacos está associada com a diminuição do volume tumoral, atraso no crescimento do mesmo e maior tempo de vida dos pacientes.<sup>26</sup>

Por outro lado, muitas das propriedades farmacológicas dos diferentes fármacos/compostos ativos podem ser melhoradas através do uso de sistemas de administração de fármacos (DDS) apropriados.<sup>46</sup> Os fármacos utilizados no tratamento do

cancro podem apresentar uma elevada toxicidade para as células normais, portanto, a possibilidade de entregá-los localmente permite melhorar a segurança e a eficácia da quimioterapia.<sup>47</sup>

## **1.2. Sistemas de administração de fármacos**

Os sistemas de administração de fármacos são o método ou processo de administração de um composto farmacêutico para obter um efeito terapêutico em humanos ou animais.<sup>48</sup> A administração de fármacos no corpo humano pode ser efetuada por diversas vias,<sup>48</sup> nomeadamente: (i) a via oral, sendo administrados como líquidos, cápsulas, comprimidos ou comprimidos mastigáveis; (ii) a via sublingual, em que os fármacos são colocados sob a língua de modo a serem absorvidos diretamente pelos vasos sanguíneos aí presentes; (iii) a via ocular, em que os fármacos são misturados com substâncias inativas para produção de um líquido, gel ou pomada para serem aplicados nos olhos; (iv) a via otológica, em forma de gotas aplicadas nos ouvidos; (v) a via nasal, em que os fármacos são atomizados de modo a poderem ser absorvidos pela membrana mucosa das fossas nasais; (vi) a via retal, em forma de supositório administrado no reto; (vii) a via vaginal, sob a forma de comprimido, creme, gel, solução ou supositório administrados na vagina; (viii) a via intravenosa, intramuscular ou subcutânea, através de uma injeção; (ix) a via cutânea, em que os fármacos são aplicados na pele para o tratamento de distúrbios superficiais; (x) e a via transdérmica, em que os fármacos são disponibilizados no corpo através de um adesivo aplicado sobre a pele.

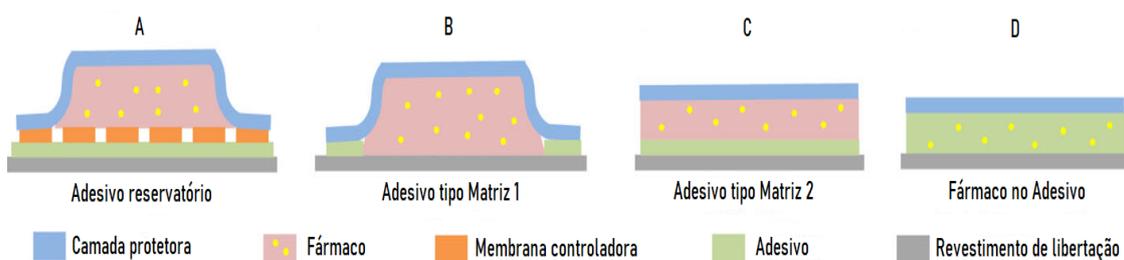
### **1.2.1. Administração transdérmica de fármacos**

Os sistemas transdérmicos de administração de fármacos, também conhecidos como “adesivos” são capazes de libertar a substância ativa e direcioná-la para os alvos em que deverá exercer o seu efeito farmacológico, além de poder controlar a sua velocidade de libertação sem alterar a estrutura química da molécula transportada.

O desenvolvimento de sistemas transdérmicos é uma estratégia interessante para o transporte de diversas classes de fármacos, tanto hidrofílicos como lipofílicos, sendo uma alternativa para ultrapassar aspetos relacionados com as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de diversos fármacos quando administrados por outras vias.<sup>49</sup>

A utilização da via transdérmica oferece outras vantagens quando comparada com as outras vias de administração, nomeadamente impede o efeito de primeira passagem hepática, responsável pela diminuição da biodisponibilidade e pela degradação de diversos fármacos, bem como evita efeitos indesejáveis no estômago, como ocorre no caso dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) administrados por via oral.<sup>1</sup> A vantagem desta via em comparação com a via intravenosa e intramuscular é ser indolor e não invasiva.

Os DDS transdérmicos disponíveis comercialmente podem ser categorizados como sistemas de reservatório e sistemas tipo matriz. Os sistemas de reservatório consistem em três componentes principais: o reservatório do fármaco, a membrana de controlo e o adesivo. O reservatório do fármaco contém o fármaco e os excipientes, e o fármaco penetra através da membrana de controlo para atingir a pele. O componente adesivo do DDS responsável pela adesão à pele pode cobrir completamente a área de libertação do fármaco (adesivo contínuo) ou pode formar um perímetro em torno de uma superfície de libertação do fármaco não aderente (adesivo periférico).<sup>50</sup> Os sistemas tipo matriz são caracterizados pela inclusão de uma matriz semissólida que contém uma solução ou suspensão de fármaco que está em contacto direto com o revestimento de libertação.<sup>51,52</sup> Na Figura 2 podemos observar uma representação dos diversos tipos de sistemas transdérmicos de libertação de fármacos.

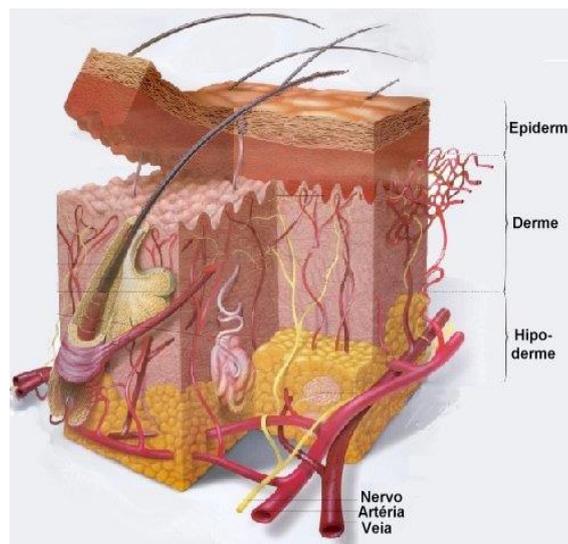


**Figura 2.** Representação de diferentes tipos de sistemas transdérmicos de libertação de fármacos: (A) Adesivo do tipo reservatório; (B, C) Adesivos do tipo matriz; (D) Fármaco incorporado no adesivo.<sup>52</sup>

A anatomia de um DDS consiste: (i) numa camada protetora, que corresponde ao componente mais externo da estrutura destes sistemas e possui um papel essencial na proteção e manutenção do fármaco no seu interior, durante o armazenamento e período de aplicação, uma vez que é inerte e impermeável a este; (ii) o adesivo, que é o

componente responsável pelo estabelecimento da ligação entre o sistema transdérmico e a pele, devendo existir um equilíbrio entre as suas propriedades coesivas e adesivas de modo a que, no decorrer do período de utilização, não ocorra o seu descolamento da pele; (iii) uma camada protetora removível, que deve garantir que aquando da sua separação, o adesivo não é danificado nem removido simultaneamente, devendo também assegurar uma adesão suficiente a este último, de forma a que não se verifique a sua remoção acidental; (iv) um reservatório/matriz – nos sistemas do tipo reservatório, o fármaco encontra-se em solução, suspensão ou numa forma semissólida (hidrogel), no caso dos sistemas matriciais, o fármaco encontra-se dissolvido ou disperso numa matriz polimérica sólida à qual se adiciona o fármaco a incorporar; (v) e uma membrana controladora, cuja função é essencialmente conter o fármaco no interior do reservatório, nos sistemas transdérmicos do tipo reservatório.<sup>53</sup>

A pele é composta por três camadas, nomeadamente a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 3). A epiderme é a camada superficial que protege a pele contra o ambiente externo, apresentando na sua superfície uma camada de células mortas, queratinosas, denominada como estrato córneo (*stratum corneum*) que funciona como barreira contra microrganismos patogénicos e controla a permeação de componentes através da pele. A derme é uma camada média de sustentação que contém os vasos sanguíneos, nervos e terminais nervosos. A hipoderme é a camada mais profunda composta principalmente por tecido adiposo.<sup>54</sup>



**Figura 3.** Representação esquemática das diferentes camadas da pele.<sup>54</sup>

A maior dificuldade associada com a administração transdérmica é a administração de uma dose suficiente dos fármacos através da pele, devido às propriedades de barreira do estrato córneo que atua como barreira impermeável aos fármacos hidrofílicos ou de alto peso molecular.<sup>2</sup> As características ideais para absorção percutânea são baixo peso molecular e solubilidade adequada em meios hidrofílicos e hidrofóbicos, no entanto, a quantidade de qualquer composto que penetre a pele também depende do tipo de sistema de administração utilizado.<sup>55</sup>

Com o objetivo de, por um lado, ultrapassar os problemas associados à impermeabilidade da pele e, por outro, de aumentar o número de fármacos candidatos à administração transdérmica, vários métodos para ultrapassar a resistência desta barreira da pele têm sido investigados, entre os quais, a utilização de promotores de permeação. Os promotores de permeação são substâncias farmacologicamente inativas que interagem com os componentes do estrato córneo, reduzindo a resistência cutânea à difusão do fármaco.<sup>56</sup> Portanto, o promotor de permeação ideal será aquele que é farmacologicamente inerte, não tóxico, de ação imediata, não irritante, não alérgico, de ação reversível, química e fisicamente compatível com o fármaco e excipientes, aceitável cosmeticamente, inodoro, insípido, incolor, acessível e com boas propriedades de solvatação.<sup>57,58</sup>

Os promotores físicos de permeação incluem por exemplo a electropermeabilização, em que as células são temporariamente expostas a pulsos elétricos que levam à formação de poros aquosos nas bicamadas lipídicas do estrato córneo, permitindo assim a difusão de fármacos na pele.<sup>59</sup> Um outro exemplo é a iontoforese, que envolve a libertação de compostos químicos com carga através da membrana da pele, usando um campo elétrico. Os fármacos são colocados no eletrodo correspondente à sua carga (positivo ou negativo) e, quando a corrente elétrica é acionada, as cargas iguais repelem-se, fazendo com que o fármaco permeie através da pele e entre na circulação sistêmica.<sup>60</sup>

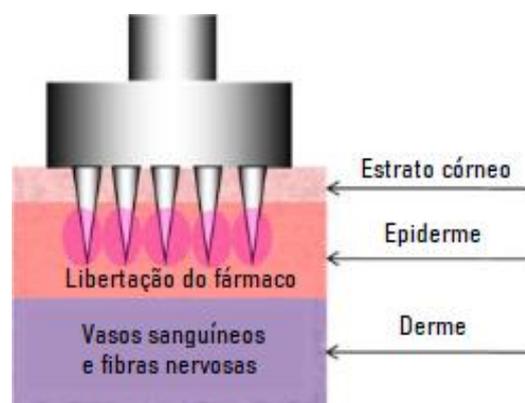
Os promotores químicos de permeação promovem a redução reversível das propriedades de barreira da pele sem danos a longo prazo para as células viáveis, podendo alterar a composição, as propriedades físico-químicas e a organização lipídica e proteica do estrato córneo.<sup>61</sup>

Com o objetivo de reforçar a solubilidade e biodisponibilidade de fármacos, novos sistemas lipídicos como microemulsões e nanopartículas lipídicas sólidas têm também sido desenvolvidos. As microemulsões são sistemas reservatórios em que a fase interna constitui um microambiente dimensionalmente restrito, podendo conter moléculas com

diferentes polaridades.<sup>62</sup> Estes sistemas apresentam uma excelente taxa de penetração em camadas profundas do estrato córneo quando comparadas a formulações convencionais, sendo consideradas como sistemas terapêuticos que apresentam grandes possibilidades de promover a permeação de fármacos através da pele.<sup>63</sup> A penetração na pele é reforçada, principalmente, devido a um aumento da sua hidratação, que é proporcionada pela formação de uma película oclusiva de algumas nanopartículas na superfície da pele. Estas não penetram pelo estrato córneo quando incorporadas em géis e cremes que não permitem a libertação do fármaco das nanopartículas; daí a necessidade da utilização de um sistema que permita essa libertação, como as formulações em espuma, que apresentam baixa densidade e habilidade de alterar a hidratação de pele.<sup>64</sup> Uma outra alternativa para a promoção da permeação cutânea, ultrapassando a barreira do estrato córneo é a utilização de dispositivos denominados por microagulhas.

### 1.3. Microagulhas

As microagulhas são dispositivos miniaturizados que possuem coleções de agulhas com menos de 2 mm de altura e possibilitam a administração de fármacos, péptidos, antígenos e DNA de forma eficiente através da pele.<sup>65</sup> As microagulhas rompem a barreira do estrato córneo da pele e criam poros (Figura 4), o que resulta numa maior penetração, podendo aumentar a permeabilidade da pele para muitos compostos, desde pequenas moléculas até proteínas e nanopartículas carregadas com fármacos que normalmente não penetram no estrato córneo.<sup>2,3</sup>



**Figura 4.** Representação esquemática do mecanismo de ação de um dispositivo de microagulhas.<sup>3</sup>

As microagulhas situam-se na interface entre os adesivos transdérmicos e as agulhas hipodérmicas. No caso das agulhas hipodérmicas, elas administram efetivamente praticamente qualquer fármaco a praticamente qualquer velocidade na pele, mas são limitadas pela dor, necessidade de conhecimento médico e dificuldade em ter uma administração controlada por longos períodos. Já os adesivos transdérmicos eliminam estas limitações, mas sofrem da incapacidade de administrar a maioria dos fármacos como discutido anteriormente.

As microagulhas devem ser grandes o suficiente para penetrar na epiderme e curtas o suficiente para não alcançar a derme e, deste modo, não causar dor. Integradas num adesivo, podem fornecer um método minimamente invasivo para aumentar a permeabilidade da pele, com um transporte baseado na difusão, o que pode possibilitar a entrega transdérmica de muitos fármacos, incluindo moléculas como proteínas.<sup>66</sup>

A sua utilização é simples, indolor e não causa sangramento, tendo ainda vantagens adicionais, tal como distribuição de fármacos, que podem ser encapsulados nas microagulhas e libertados na corrente sanguínea através de um adesivo colocado na pele.<sup>67</sup> O facto de a sua utilização ser indolor é explicado pelo facto da barreira do estrato córneo da pele não ter nervos, ou seja, a anatomia da pele oferece a oportunidade de perfurar agulhas no estrato córneo sem estimular os nervos.<sup>68</sup> As microagulhas apresentam ainda outras vantagens, entre elas: a possibilidade de administração de moléculas de elevado peso molecular; o metabolismo de primeira passagem é evitado; a rápida cicatrização no local da injeção comparativamente às agulhas hipodérmicas; o facto de os pacientes não demonstrarem medo das microagulhas; a facilidade de administração; a diminuição da penetração microbiana em comparação com uma agulha hipodérmica, uma vez que apenas é perfurada a epiderme; a administração do fármaco pode ser direcionada para uma área específica da pele; um aumento da eficácia do fármaco pode resultar na redução da dose; e boa tolerância, sem edema ou eritema para aplicações alongo prazo.<sup>67</sup>

No entanto, existem também desvantagens entre as quais: uma menor precisão da dosagem do que com agulhas hipodérmicas; a necessidade de um uso cuidadoso do dispositivo para evitar que a dose escape ou penetre na pele em diferentes graus; como a espessura do estrato córneo e outras camadas da pele varia de indivíduo para indivíduo, a profundidade de penetração das microagulhas pode também variar; o ambiente externo, como a hidratação da pele, pode afetar a entrega e a ponta da microagulha pode romper-se e permanecer dentro da pele após a remoção do adesivo.<sup>51,67</sup>

As microagulhas foram referidas pela primeira vez em 1976, mas foi no final da década de 90, que se tornaram objeto de uma pesquisa significativa devido aos avanços na área da microfabricação.<sup>69</sup> No primeiro artigo publicado sobre este tema, Henry *et al.* descreveram o uso de microagulhas sólidas de sílica para facilitar a entrega de um fármaco modelo na pele humana excisada *in vitro*.<sup>70</sup> Desde então, estes dispositivos têm sido extensivamente investigados. Em 2004, sugeriu-se que as microagulhas pudessem ser usadas para permitir o transporte transdérmico de macromoléculas e possivelmente complexos supramoleculares e micropartículas.<sup>68</sup> Na última década, uma extensa pesquisa foi realizada sobre a tecnologia das microagulhas, usando uma ampla variedade de materiais e designs.

As primeiras microagulhas foram fabricadas com sílica, metais, cerâmica e vidro. No entanto, atualmente os polímeros desempenham um papel central na preparação de microagulhas.<sup>71</sup>

### 1.3.1. Tipos de microagulhas

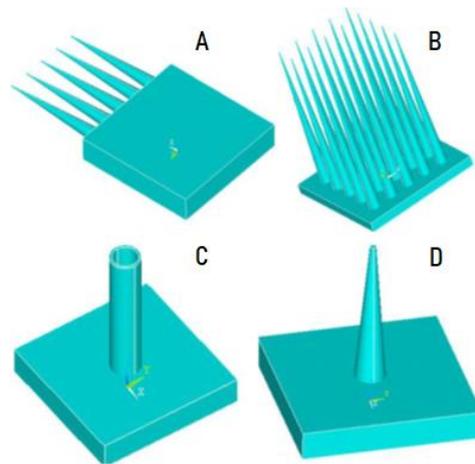
As microagulhas podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura, forma, forma da ponta, comprimento, material utilizado para a sua fabricação e aplicações.<sup>72</sup> As categorias de microagulhas estão sumariadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Categorias de microagulhas.

<b>Estrutura</b>	<b>Forma</b>	<b>Forma da ponta</b>	<b>Material utilizado</b>
Sólida	Cilíndrica	Vulcão	Sílica
Oca	Cônica	Presa de cobra	Vidro
No plano	Piramidal	Micro-hipoderme	Polímeros
Fora do plano	Quadrada	Cônica	Metal

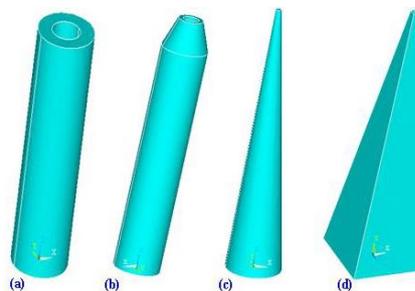
Com base na estrutura, as microagulhas são classificadas como microagulhas no plano (Figura 5A) e fora do plano (Figura 5B). Nas microagulhas no plano, o eixo da microagulha é paralelo à superfície do substrato.<sup>73</sup> Uma grande vantagem das microagulhas no plano é que o comprimento das microagulhas pode ser fácil e precisamente controlado durante o processo de fabricação.<sup>72</sup> A limitação destas microagulhas é que é difícil fabricar matrizes de microagulhas com geometria

bidimensional. Nas microagulhas fora do plano, o comprimento das microagulhas projeta-se para fora da superfície do substrato.<sup>73</sup> As microagulhas podem ainda ser classificadas como sólidas (Figura 5C) ou ocas (Figura 5D). As microagulhas ocas têm um orifício interno ou lúmen que permite o fluxo de fluido/fármaco através das mesmas. As microagulhas sólidas possuem lumens sólidos e exibem maior resistência do que as microagulhas ocas.<sup>73</sup>



**Figura 5.** (A) Microagulhas no plano; (B) Microagulhas fora do plano; (C) Microagulhas ocas; (D) Microagulhas sólidas.<sup>4</sup>

A forma das microagulhas é muito importante, podendo estas ser classificadas com base na sua forma geral ou na forma da sua ponta. Na Figura 6 estão representadas esquematicamente quatro tipos de microagulhas, de acordo com a sua forma, nomeadamente cilíndrica, ponta cónica, cónica e piramidal.



**Figura 6.** Formas de microagulhas. (a) Cilíndrica; (b) Ponta cónica; (c) Cónica; (d) Piramidal.<sup>4</sup>

As microagulhas são também classificadas com base nos materiais utilizados, uma vez que a seleção deste é extremamente importante para projetar e fabricar microagulhas para qualquer aplicação específica. Um dos primeiros materiais a ser utilizado na produção de microagulhas foi a sílica que é um material frágil e que pode ser prejudicial à saúde.<sup>74</sup> Também os metais, como o aço inoxidável, o titânio, o paládio e o níquel, são utilizados na produção de microagulhas por apresentarem boa biocompatibilidade e boas propriedades mecânicas.<sup>75</sup> Mais recentemente, começaram a ser estudados materiais poliméricos, que são materiais com propriedades facilmente ajustáveis, muitos são biocompatíveis e possuem boas propriedades mecânicas e químicas favoráveis à fabricação de microagulhas.<sup>76</sup> Entre os polímeros mais usados podemos encontrar o ácido poliglicólico (PGA), o ácido poli(L-lático) (PLLA), o poli(metacrilato de metilo) (PMMA), o ácido polivinílico (PVA) e o poliestireno (PS).<sup>69</sup> Os polímeros naturais, como polissacarídeos (ex.: celulose), proteínas (ex.: colagénio) e DNA, têm também sido explorados nesta área devido à sua biodegradabilidade, não citotoxicidade, variedades de estruturas químicas e caráter renovável. Os polímeros são usados principalmente para produzir microagulhas solúveis e intumescíveis, mas existem estudos que os utilizam na produção de microagulhas sólidas,<sup>77</sup> ocas<sup>78</sup> e revestidas.<sup>79</sup>

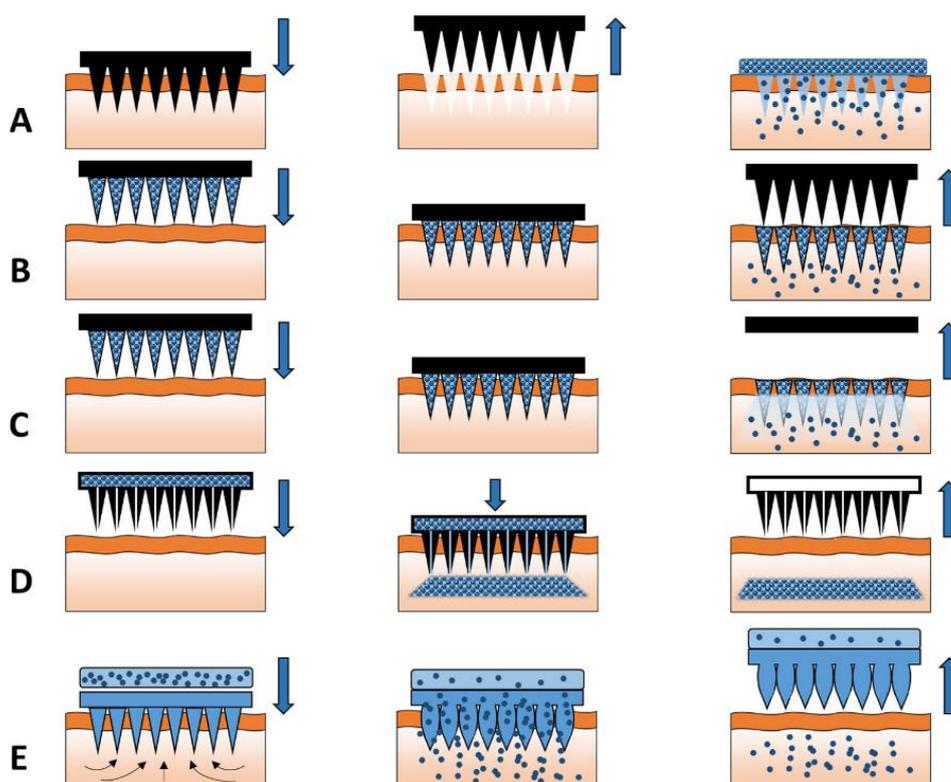
### **1.3.2. Estratégias de administração de fármacos usando microagulhas**

Várias estratégias específicas têm sido estudadas para o uso de microagulhas na entrega transdérmica de fármacos.<sup>68</sup> A abordagem “*poke with patch*” (Figura 7A) utiliza microagulhas sólidas, que são aplicadas na pele para criar poros transitórios no estrato córneo. Em seguida, são aplicadas formulações de fármacos convencionais, como adesivos transdérmicos, pomadas, cremes, géis ou loções, podendo o transporte ocorrer por difusão passiva ou iontoforese, no caso de ser aplicado um campo elétrico. A principal limitação dessa abordagem é a exigência de um processo de aplicação em duas etapas, o que pode levar a problemas de praticidade para os pacientes.<sup>69</sup>

Outra abordagem é a “*coat and poke*” (Figura 7B), utilizada nas microagulhas revestidas, e que consiste em revestir as matrizes das microagulhas com uma formulação de fármaco antes da aplicação na pele. Após a inserção, a formulação será dissolvida. As formulações farmacêuticas são aplicadas isoladamente ou combinadas com materiais poliméricos, geralmente por revestimento por imersão.<sup>80</sup> Este tipo de microagulhas tem sido utilizado na entrega rápida de macromoléculas, como vacinas, proteínas, peptídeos

e DNA na pele, permitindo um processo de aplicação simples numa etapa, mas tendo como principal limitação a quantidade restrita de fármaco que pode ser revestida na área finita da superfície das estruturas de microagulhas.<sup>81</sup>

As microagulhas solúveis utilizam uma estratégia de administração baseada na abordagem “*poke and release*” (Figura 7C) em que a inserção da microagulha na pele é seguida pela dissolução das pontas das mesmas em contato com o fluido intersticial da pele. O conteúdo é libertado ao longo do tempo, através de uma entrega controlada. O principal benefício é o baixo custo dos materiais poliméricos usados.<sup>69</sup>



**Figura 7.** Representação esquemática de estratégias de administração de fármacos usando microagulhas. (A) “*poke with patch*” usando microagulhas sólidas; (B) “*coat and poke*” usando microagulhas revestidas; (C) “*poke and release*” usando microagulhas solúveis; (D) “*poke and flow*” usando microagulhas ocas; (E) e microagulhas de hidrogéis.<sup>69</sup>

Uma variação da abordagem anterior é a “*poke and flow*” (Figura 7D), utilizada nas microagulhas ocas. Elas permitem a entrega de um fármaco específico na pele através da injeção de uma formulação fluida, bem como a entrega contínua de moléculas através da pele pelo seu orifício, usando diferentes métodos: difusão ou fluxo acionado por

pressão ou eletricamente.<sup>59</sup> Tais sistemas são capazes de fornecer quantidades maiores de substâncias ativas em comparação com as microagulhas sólidas, revestidas ou solúveis. A principal limitação é o potencial de entupimento das aberturas da agulha com o tecido durante a inserção na pele.<sup>71</sup>

As microagulhas de hidrogéis são preparadas a partir de materiais poliméricos reticulados. Após a inserção, as agulhas de hidrogel absorvem o fluido intersticial e intumescem, permitindo que os fármacos do adesivo se difundam através da estrutura para a pele (Figura 7E).<sup>82</sup>

### 1.3.3. Aplicações

As microagulhas têm sido exploradas para diferentes aplicações que se estendem a diversos campos, sendo a administração de fármacos a mais estudada. Como referido anteriormente, Henry *et al.* publicou o primeiro trabalho de pesquisa usando microagulhas para administração transdérmica de fármacos.<sup>70</sup> Desde então, esta abordagem tem sido amplamente explorada, utilizando microagulhas produzidas com diferentes materiais.<sup>67</sup>

As microagulhas podem ser usadas para a administração de compostos de alto peso molecular como proteínas e péptidos, produtos imunobiológicos como vacinas e anticorpos, agentes bioativos e biomacromoléculas como a insulina, a heparina, a albumina ou hormonas de crescimento.

Macromoléculas bioativas como a insulina, a heparina e as hormonas do crescimento não são administradas por via oral devido à degradação proteolítica e à absorção que é prejudicada.<sup>67</sup> A maioria dos produtos disponíveis comercialmente é administrada por via parenteral, sendo, por isso, desejável uma via não invasiva adequada.<sup>67</sup> Verbaan *et al.* estudaram a administração de macromoléculas com peso molecular variável na pele através do uso de microagulhas, revelando que as matrizes de microagulhas aprimoram o transporte através da pele humana para compostos de baixo e alto peso molecular.<sup>83</sup>

Os produtos imunobiológicos são também convencionalmente administrados através de injeção por via subcutânea, intramuscular ou intradérmica. No entanto, o procedimento de vacinação convencional sofre de desvantagens como a fobia a agulhas e a dor associada à inserção da agulha na pele.<sup>84</sup> O principal tipo de microagulhas utilizado para fins de vacinação são microagulhas solúveis.<sup>69</sup> Sullivan *et al.* comparou a

resposta imune à vacinação contra o vírus Influenza administrada por microagulhas poliméricas solúveis, microagulhas sólidas revestidas e por injeção intramuscular.<sup>85</sup> Os investigadores concluíram que a eliminação do vírus do pulmão foi 1000 vezes mais eficiente quando a vacina foi administrada por microagulhas solúveis do que por injeção intramuscular.<sup>85</sup>

Vários estudos têm também sido realizados sobre a aplicação das microagulhas na área do tratamento do cancro da pele. Por exemplo, para fins de diagnóstico, têm sido usadas como uma alternativa à biópsia, uma vez que conseguem atingir o fluido intersticial, permitindo a captura de biomarcadores da pele.<sup>86,87</sup>

A extração comum de sangue para fins de diagnóstico apresenta algumas desvantagens, incluindo fobia por agulhas, necessidade de profissionais de saúde treinados e risco de infeção associada a agulhas convencionais, entre outros.<sup>69</sup> As microagulhas têm o potencial de superar estas limitações, permitindo, por exemplo, a extração de fluido intersticial da pele. Este fluido representa um bom meio para a monitorização de diferentes analitos, uma vez que a concentração de moléculas nele pode frequentemente ser correlacionada com precisão com as suas concentrações sanguíneas. Portanto, as microagulhas oferecem a possibilidade de um sistema de diagnóstico sem dor e sem sangue.<sup>88</sup>

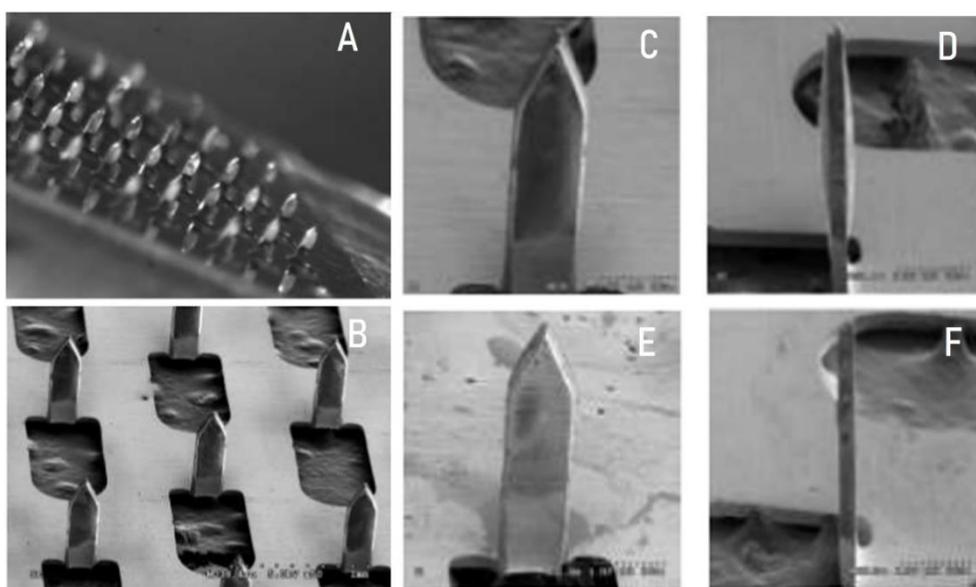
A indústria cosmética tem também demonstrado um grande interesse na tecnologia das microagulhas, para o tratamento não cirúrgico e não ablativo de condições da pele, como o envelhecimento (rugosidade), cicatrizes (devido ao acne ou a intervenções cirúrgicas), hiperpigmentação e perda de cabelo.<sup>88,89</sup> O processo facilita e estimula a reparação natural da pele, sem causar danos epidérmicos permanentes. As microagulhas são usadas principalmente no tratamento de manchas na pele e na entrega de ingredientes cosméticos ativos.<sup>89</sup>

Embora tenha havido um progresso significativo na área da aplicação transdérmica de microagulhas para administrar fármacos sistemicamente através da pele, existe uma oportunidade de expandir a sua aplicação no tratamento de doenças dermatológicas mais graves, como é o caso de melanomas.<sup>90</sup> A sua utilização para administração de fármacos para o tratamento de melanomas foi iniciada por Donnelly *et al.* em 2008.<sup>91</sup> Com o uso de microagulhas sólidas de sílica e um adesivo com ácido aminolevulínico (ALA), tentaram melhorar a administração de ALA na pele. Este foi o primeiro estudo a demonstrar a entrega localizada de um foto-sensibilizador.<sup>91</sup> Após esses

estudos, vários grupos exploraram diferentes modelos de microagulhas para administrar uma variedade de fármacos anticancerígenos.<sup>90</sup>

Por exemplo, Jain *et al.* desenvolveram microagulhas de aço inoxidável revestidas com ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) para melhorar a distribuição dérmica do fotossensibilizador para tratar tumores da pele. O grupo mostrou que o adesivo de microagulhas revestido com 5-ALA permitiu uma entrega melhorada de 5-ALA mais profundamente na lesão tumoral em comparação com a aplicação tópica de creme contendo 5-ALA (Figura 8).<sup>92</sup> Por outro lado, Naguib *et al.* demonstraram a viabilidade do uso de microagulhas de metal sólidas para melhorar a administração intradérmica de 5-FU (5-fluorouracil) para tratar melanomas, mostrando que a aplicação tópica de creme 5-FU (5%) na pele perfurada por microagulhas inibe significativamente o tumor.<sup>93</sup> Embora de natureza preliminar, esses estudos destacam que as microagulhas têm um grande potencial na melhoria da administração intradérmica de agentes antineoplásicos para melhorar a eficácia do tratamento do cancro da pele.<sup>90</sup>

Mais recentemente, vários grupos começaram a explorar a estratégia de administrar vacinas anti-melanoma, usando microagulhas, como um método para tratar e prevenir o desenvolvimento deste tipo de cancro.<sup>94,95</sup>



**Figura 8.** Micrografias de amostras de microagulhas revestidas com 5-ALA obtidas usando (A) um estereomicroscópio de campo claro e (B) um microscópio eletrônico de varrimento. Micrografia eletrônica de varrimento de microagulhas revestidas com 5-ALA: (C, D) antes da inserção e (E, F) após inserção por 5 min na pele suína *in vitro*.<sup>92</sup>

## **1.4. Microagulhas biopoliméricas**

Os biopolímeros são polímeros naturais sintetizados por organismos vivos, ou seja, são biomoléculas poliméricas constituídas por monómeros como os monossacarídeos, ácidos nucleicos, ou aminoácidos.<sup>96</sup> As características mais importantes destas macromoléculas são a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, natureza não tóxica e capacidade de poderem ser hidrolisadas em produtos removíveis e não tóxicos.<sup>96</sup> As microagulhas poliméricas devem possuir as seguintes características: biocompatibilidade sem desencadear resposta imune, força suficiente para penetrar a barreira do estrato córneo, serem fabricadas de modo a evitar danos em fármacos sensíveis, nomeadamente proteínas, péptidos e vacinas, e permitirem a entrega controlada e rápida de ingredientes ativos.<sup>5</sup>

Os polissacarídeos e as proteínas são as famílias de biopolímeros mais utilizadas no fabrico de microagulhas.<sup>6</sup> Estas moléculas possuem semelhanças químicas com os componentes da matriz extracelular e são facilmente reconhecidos e aceites pelo corpo humano e, após a absorção, são eliminados pelo metabolismo ou por excreção através do sistema renal.<sup>97</sup> Dependendo de seu comportamento *in vivo*, as microagulhas biopoliméricas podem ser classificadas em solúveis, intumescíveis e biodegradáveis.<sup>6</sup> Para a entrega de fármacos, as microagulhas são frequentemente desenvolvidas usando polímeros solúveis e biodegradáveis,<sup>5</sup> enquanto que para a extração do fluido intersticial dérmico, são utilizadas microagulhas intumescíveis, que podem absorver quantidades razoáveis de água quando inseridas em ambientes aquosos.<sup>5</sup>

### **1.4.1. Microagulhas biopoliméricas solúveis**

As microagulhas solúveis são fabricadas usando macromoléculas solúveis em água que se dissolvem após a inserção na pele.<sup>98</sup> A maioria dos polímeros solúveis são polissacarídeos como o dextrano, o sulfato de condroitina de sódio e o alginato de sódio e o ácido hialurónico (HA) e a amilopectina. Estes polissacarídeos contêm grupos hidrofílicos ou são ramificados, o que lhes confere uma excelente solubilidade em água, e permite que as microagulhas à base destes polissacarídeos se dissolvam muito rapidamente quando inseridas na pele.<sup>5</sup> As microagulhas solúveis fornecem uma alternativa à administração de fármacos em doses menores do que aquelas administradas por meio de injeções, reduzindo não apenas os efeitos sistémicos, mas também os custos dos tratamentos.<sup>6</sup> Além disso, como a formulação do fármaco é incorporada como parte

da matriz das microagulhas, o carregamento e a libertação do fármaco são precisos.<sup>98</sup> No entanto, o facto de este tipo de microagulhas apresentar uma menor resistência mecânica pode dificultar a inserção na pele.<sup>6</sup>

#### **1.4.2. Microagulhas biopoliméricas biodegradáveis**

As microagulhas biodegradáveis são fabricadas usando polissacarídeos e proteínas que se degradam após a inserção na pele.<sup>6</sup> Os polímeros biodegradáveis não se dissolvem nem expandem em contacto com a água, mas podem ser degradados num período de tempo mais longo comparativamente aos polímeros solúveis.<sup>99</sup> Os polímeros mais utilizados são a quitina, o quitosano, o amido e a seda.<sup>100,101,102</sup> Devido às suas propriedades químicas e biológicas, este tipo de polímeros é degradado em componentes não tóxicos, que são eliminados do corpo através de vias metabólicas.<sup>99</sup> Assim, este tipo de polímeros naturais são muito utilizados na preparação de microagulhas para entrega controlada de fármacos de libertação prolongada.<sup>5</sup>

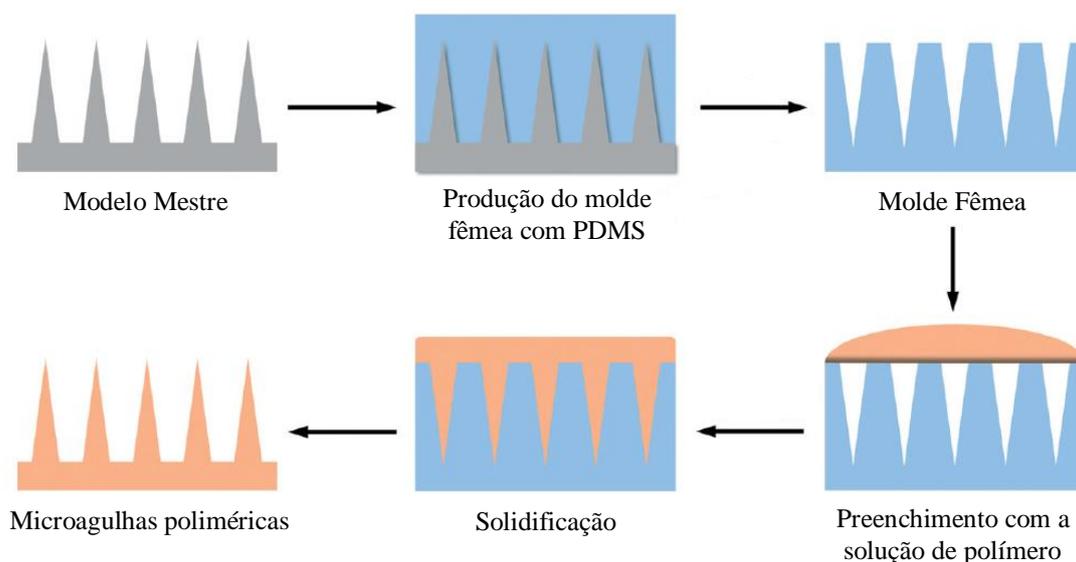
#### **1.4.3. Microagulhas biopoliméricas intumescíveis**

As microagulhas intumescíveis são fabricadas usando hidrogéis que, devido à sua estrutura reticulada, aumentam de volume na pele sem se dissolverem.<sup>103</sup> Assim sendo, estes biopolímeros permitem não só a libertação de fármacos pré-carregados, mas também a extração de fluido intersticial.<sup>103</sup> Para a produção deste tipo de microagulhas tem sido reportado o uso de HA metacrilatado e seda modificada.<sup>103,104</sup> Em comparação com os tipos de microagulhas biopoliméricas mencionados anteriormente, estas permitem a interrupção do tratamento caso ocorram reações adversas ao fármaco, ou em caso de sobredosagem.<sup>6</sup> É importante salientar que estas microagulhas devem ter resistência mecânica suficiente no seu estado seco, para permitir a penetração no estrato córneo, e reter parcialmente essa tenacidade no seu estado hidratado, de forma a que seja possível a sua remoção intacta da pele.<sup>5</sup>

#### **1.4.4. Fabrico de microagulhas biopoliméricas**

Existem diversos métodos de fabrico de microagulhas baseados em várias técnicas diferentes, sendo eles a fotolitografia, produção contínua de interface de líquido, micromoldagem, impressão 3D, litografia de extração, entre outros.<sup>5</sup> A micromoldagem é o método mais utilizado por ser eficiente, de baixo custo, apresentar uma boa

reprodutibilidade e ser fácil de aplicar em produções de grande escala.<sup>5</sup> Este processo envolve seis passos, nomeadamente a produção do modelo mestre, preparação do molde fêmea das microagulhas, moldagem do polímero no molde fêmea, remoção de bolhas por centrifugação ou vácuo, solidificação por secagem ou fotopolimerização, e finalmente remoção das microagulhas do molde fêmea (Figura 9).



**Figura 9.** Esquema do processo de fabrico de microagulhas poliméricas por micromoldagem com um molde de polidimetilsiloxano (PDMS).<sup>5</sup>

Os moldes fêmea usados no segundo passo devem transcrever totalmente as microestruturas do modelo mestre e podem ser feitos de vários materiais, sendo o polidimetilsiloxano (PDMS) o mais utilizado devido à sua boa capacidade de transcrição, boa estabilidade térmica e baixa adesão, o que facilita a separação das microagulhas do molde.<sup>105</sup> Embora a micromoldagem apresente muitas vantagens para a preparação de microagulhas poliméricas, ainda existem algumas limitações, nomeadamente o facto de ser um método complexo com vários passos demorados, o que pode causar a perda de atividade de ingredientes ativos encapsulados nas microagulhas, e também por necessitar de calor ou luz ultravioleta, o que limita a possibilidade de utilizar ingredientes ativos sensíveis, como peptídeos, proteínas e vacinas.<sup>103</sup>

#### 1.4.5. Microagulhas biopoliméricas no transporte transdérmico de fármacos

Para a entrega transdérmica de fármacos, os ingredientes ativos podem ser incorporados na matriz das microagulhas, nomeadamente nas pontas e na base, ou revestidos na superfície da sua estrutura.<sup>6</sup> Para controlar a libertação de fármacos, estes também podem ser pré-carregados em nanopartículas que são então encapsuladas na matriz.<sup>5</sup> No caso das microagulhas solúveis, tendo em conta que o ingrediente ativo se encontra incorporado na matriz das microagulhas e é libertado à medida que estas se dissolvem, é possível manipular a cinética de libertação do ingrediente ativo através da natureza do polímero e da sua taxa de dissolução.<sup>69</sup> A escolha do polímero é então um passo chave para se obter as características de dissolução desejadas.<sup>3</sup> Por exemplo, biopolímeros solúveis, como o dextrano, o sulfato de condroitina de sódio, a hidroximetilpropilcelulose (HPMC) e a carboximetilcelulose (CMC), têm sido amplamente estudados para produção de microagulhas para administração de fármacos como a desmopressina e o donepezilo.<sup>5,106</sup>

O pululano é um polissacarídeo não iónico produzido pelo fungo *Aureobasidium pullulans*.<sup>7</sup> Este biopolímero apresenta propriedades interessantes para fins biomédicos, nomeadamente a sua não toxicidade, solubilidade em água, possibilidade de produção de soluções de baixa viscosidade, excelente capacidade de formação de filmes, adesividade e bom desempenho mecânico.<sup>107</sup> O uso de pululano tem captado especial interesse para diversas aplicações no domínio dos materiais de base biológica, nomeadamente no desenvolvimento de sistemas para libertação de fármacos para tratamento de cancro.<sup>108</sup> Por exemplo, microesferas de pululano podem atuar como sistemas eficientes de entrega de fármacos com elevada permeabilidade e efeito de retenção. Os fármacos conjugados com estes sistemas de pululano tendem a acumular-se mais no tumor ou no tecido/células danificadas do que nos tecidos normais, para além de que reduzem a toxicidade do fármaco em relação às células normais.<sup>108</sup> Num estudo realizado por Fundueanu *et al.*, poli(N-isopropilacrilamida-co-acrilamida) foi enxertada em microesferas de pululano atuando como sistemas de administração de fármacos não-tóxicos, dependentes da temperatura, confirmando-se que o uso deste biopolímero confere estabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade às microesferas.<sup>109</sup>

Noutro estudo, por derivatização do pululano, sintetizaram bioconjugados deste polímero com doxorrubicina (DOX) e ácido fólico.<sup>110</sup> Este estudo sugere que os novos bioconjugados de DOX-pululano possuem propriedades adequadas para o

direcionamento de fármacos e a incorporação em células cancerígenas.<sup>110</sup> Tao *et al.*, utilizaram NPs de pululano modificadas com colesterol como sistemas de administração de fármacos antitumorais, tendo avaliado o efeito do tamanho das NPs no direcionamento passivo dos fármacos e a eficiência do mesmo, concluindo que o uso das NPs de pululano com os fármacos permitem eliminar as células cancerígenas através da libertação de fármacos fora das células.<sup>111</sup>

O uso de pululano no desenvolvimento de microagulhas solúveis incorporadas com insulina foi estudado por Fonseca *et al*, no qual os sistemas foram caracterizados mecânica e morfológicamente, sendo também avaliada a sua eficiência *in vitro* na entrega da insulina.<sup>10</sup> Contudo, o pululano nunca foi estudado para produzir microagulhas solúveis para aplicação no tratamento de cancro de pele.

Neste contexto, e como forma de contribuir para o desenvolvimento de sistemas eficientes para o tratamento do cancro da pele, o principal objetivo desta dissertação é a preparação e caracterização de microagulhas de pululano contendo com nanopartículas de ouro funcionalizadas com fucoidano, que é um polissacarídeo com propriedades anticancerígenas, com potencial aplicação no tratamento não invasivo de cancro da pele.

## 2. Materiais e Métodos

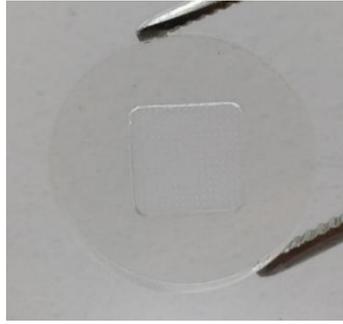
Neste capítulo apresentam-se todos os reagentes e materiais usados na preparação dos sistemas de microagulhas solúveis de pululano com NPs de ouro funcionalizadas com fucoidano, bem como as técnicas de caracterização utilizadas para avaliar a sua morfologia, propriedades mecânicas e citotoxicidade *in vitro*.

### 2.1. Reagentes, materiais e células

O pululano (98% e MW 272 kDa) foi adquirido ao grupo B&K Technology (China). O hidrogenotetracloro de ouro (III) trihidratado (HAuCl<sub>4</sub>), o fucoidano (extraído da alga *Fucus vesiculosus*) e o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, 98%) foram comprados à Sigma-Aldrich. A solução de tampão fosfato (PBS, pH 7,4), Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal de bovino, L-glutamina, penicilina/estreptomicina e fungizone foram obtidos da Gibco® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A linha celular A375 de melanoma humano foi obtida da Cell Lines Services (Eppelheim, Alemanha).

### 2.2. Preparação das microagulhas de pululano

Os sistemas de microagulhas foram preparados por micromoldagem utilizando moldes de PDMS com 15×15 microagulhas de dimensão (Figura 10). A solução de pululano (10% e 20% m/v) foi colocada no molde das microagulhas de modo a que todos os orifícios estivessem preenchidos. De seguida, os moldes foram colocados em tubos de centrifuga e foram centrifugados (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R) durante 5 minutos a 6000 rpm, para remover as bolhas de ar e para que todos os orifícios do molde fossem preenchidos. A centrifugação foi repetida até não se verificar a existência de bolhas no molde, que foi posteriormente deixado na estufa a 30 °C durante a noite.



**Figura 10.** Fotografia digital do molde de PDMS utilizado para preparar as microagulhas de pululano.

### **2.3. Síntese de nanopartículas de ouro funcionalizadas com fucoídano**

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas segundo o protocolo descrito na literatura.<sup>116</sup> Resumidamente, 490  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (5,1 mM) foram adicionados a dois tubos de reação com 5 mL de soluções de fucoídano com 0,1 e 0,05% (m/v), respectivamente. As misturas foram aquecidas a 120 °C durante 1 minuto num Microondas Anton Paar, Monowave 300. Após a reação, as nanopartículas foram centrifugadas durante 30 minutos a 15000 rpm e 4 °C, sendo lavadas 2 vezes com água ultrapura. As amostras foram armazenadas a 4 °C.

### **2.4. Preparação das microagulhas de pululano contendo AuNPs/fucoídano**

O pululano foi dissolvido em água ultrapura, sob agitação constante, para se obter uma solução com concentração 20% (m/v). Nesta solução foram incorporadas as AuNPs/fucoídano com uma concentração de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em seguida, aproximadamente 50  $\mu\text{L}$  dessa solução foram adicionados aos moldes de PDMS e centrifugados (Centrífuga Hettich Rotofix 32<sup>a</sup>) durante 10 minutos a 6000 rpm, para que todos os orifícios do molde fossem preenchidos. Depois, à camada centrifugada, foram novamente adicionados cerca de 50  $\mu\text{L}$  da solução de polímero, que foi posteriormente deixado na estufa a 30 °C durante a noite.

## **2.5. Caracterização das amostras**

### **2.5.1. Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis)**

Os espectros de absorção de UV-Vis das soluções coloidais de Au NPs foram registados usando um espectrofotómetro Jasco V-560 UV/VIS (190-900 nm), usando cuvets de quartzo e o respetivo solvente como referência.

### **2.5.2. Espetrometria de plasma acoplado indutivamente (ICP)**

A análise química do elemento ouro foi realizada num espectrómetro Jobin Yvon 70 Plus. De forma a garantir a solubilização de todos os elementos, as amostras foram digeridas com uma solução de HCl/HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> e posteriormente sujeitas a aquecimento num forno micro-ondas.

### **2.5.3. Dispersão dinâmica de luz (DLS)**

A análise do tamanho de partículas e medição do potencial Zeta das soluções coloidais de Au NPs foi realizado usando um ZetaSizer Nano ZS (green badge) modelo Zen3500 da Malvern.

### **2.5.4. Análise morfológica das microagulhas**

A caracterização morfológica das microagulhas foi realizada recorrendo a uma lupa Nikon SMZ18. Foi medida a altura de 15 microagulhas de forma aleatória em 3 sistemas de microagulhas de cada amostra. As alturas foram medidas recorrendo ao programa NIS-Elements, versão 4.50,00, Copyright 1991-2015 Laboratory imaging.

Adicionalmente, as microagulhas obtidas foram também examinadas num microscópio ótico (Olympus BX51) cujo poder de ampliação da lente ocular foi de 5× e a ampliação da lente da objetiva foi de 5×, dando uma ampliação total de 25×. O processamento de imagens foi realizado usando o software de imagem NIS Elements.

### **2.5.5. Análise mecânica das microagulhas**

Para a caracterização mecânica foi realizado um teste de compressão axial recorrendo a um equipamento TA.XT. Plus C equipado com uma sonda de aço inoxidável

com 2 mm de diâmetro. Os dados do teste foram obtidos pelo programa Exponent connect, versão 7.0.3.0, copyright 2019, registado à Universidade de Aveiro. As definições do aparelho foram as seguintes, modo de teste: compressão, velocidade pré teste: 0,1 mm s<sup>-1</sup>, velocidade de teste: 0,01 mm s<sup>-1</sup> e velocidade pós teste: 10,0 mm s<sup>-1</sup>.

### 2.5.6. Teste de inserção em parafilme

Relativamente ao teste de inserção, o parafilme foi dobrado em oito camadas, de modo a simular a espessura da pele excisada. As microagulhas foram inseridas nas camadas de parafilme usando o Texture Analyser TA.XT. Plus C, aplicando uma força de 40 N durante 30 segundos. De modo a analisar a taxa de inserção e profundidade, cada camada de parafilme foi observada ao microscópio ótico (Olympus BX51) e o número de orifícios (em cada camada) foi contado.

### 2.6. Citotoxicidade *in vitro*

O potencial citotóxico das amostras foi avaliado nas linhas celulares HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados e não cancerígenos) e A375 (células de melanoma humano) usando o ensaio do MTT. O ensaio envolve a conversão do MTT, solúvel em água, no formazano, insolúvel em água, cuja concentração após solubilização é determinada pela absorbância a 570 nm (ISO 10993-5:2009(E)). As células cresceram em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal de bovino, 2 mM L-glutamina, 10 000 U mL<sup>-1</sup> penicilina/estreptomicina e 250 µg mL<sup>-1</sup> fungizone a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera humidificada. As células foram observadas diariamente num microscópio eclipse T100 (Nikon, Tóquio, Japão).

O teste foi realizado com os sistemas de microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano. Como controlo negativo as células foram expostas apenas ao meio e a viabilidade celular foi calculada relativamente às células controlo, segundo a fórmula que se segue:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{amostra} - Abs_{DMSO}}{Abs_{amostra} - Abs_{DMSO}} \times 100$$

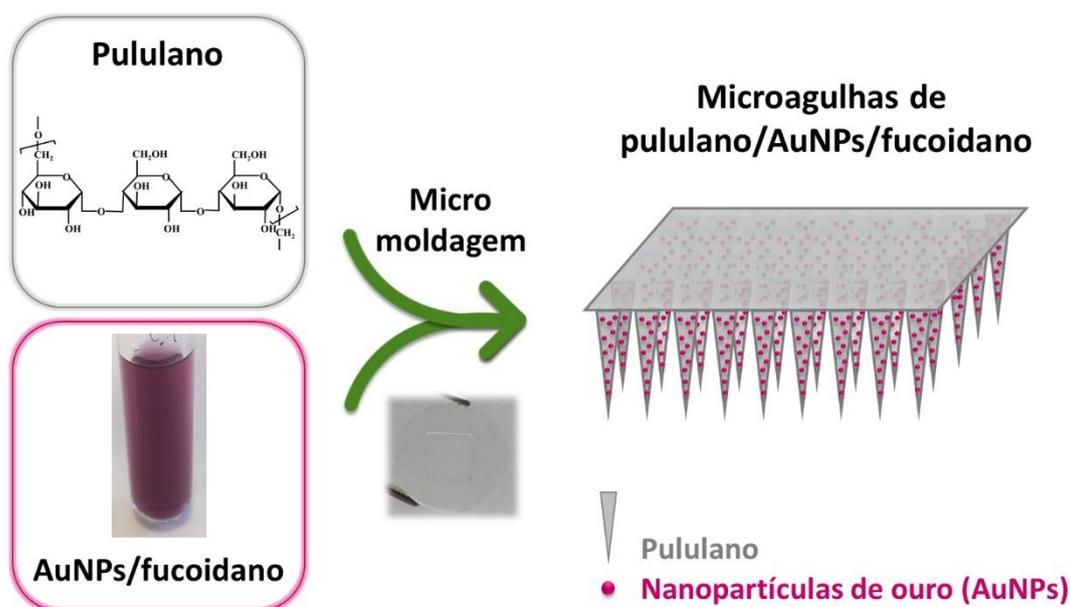
As amostras foram esterilizadas recorrendo a vários ciclos de exposição a radiação ultravioleta. Posteriormente, foram incubadas com 1,5 mL de meio DMEM completo a

37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para preparação do extrato. Foram preparadas placas com 6000 células/poço e estas foram incubadas no meio de cultura durante 24 h para adesão. Após as 24 h, o meio foi retirado dos poços e substituído por 100 µL do extrato, e as células incubadas durante mais 24 h. O extrato foi previamente diluído 1:2 com meio DMEM.

No final da incubação, adicionou-se 50 µL de MTT (1 g L<sup>-1</sup>) a cada poço e incubaram-se as placas durante 4 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> com atmosfera humidificada. Posteriormente, o meio de cultura com MTT foi removido e substituído por 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a placa colocada num agitador por 2 h no escuro de forma a dissolver completamente os cristais de formazano. A absorbância das amostras foi medida com um BioTek Synergy HT plate reader (Synergy HT Multi-Mode, BioTeK, Winooski, VT) a 570 nm com correções de branco.

### 3. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da preparação e a caracterização das microagulhas de pululano, das nanopartículas de ouro (AuNPs) e do sistema de microagulhas pululano/AuNPs/fucoidano. O primeiro passo relativo à produção das microagulhas consistiu na otimização da concentração de pululano (10 e 20% m/v), seguido da síntese por micro-ondas das AuNPs funcionalizadas com fucoidano (0,1 e 0,05%, m/v), e posteriormente a incorporação das AuNPs/fucoidano na formulação das microagulhas de pululano (Figura 11) como agente anticancerígeno para o tratamento de melanoma.<sup>116</sup> As microagulhas foram caracterizadas em termos de morfologia, desempenho mecânico, inserção num modelo físico de pele, e o seu potencial citotóxico foi avaliado nas linhas celulares HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados e não cancerígenos) e A375 (células de melanoma humano).



**Figura 11.** Representação esquemática da preparação do sistema de microagulhas solúveis de pululano e nanopartículas de ouro funcionalizadas com fucoidano.

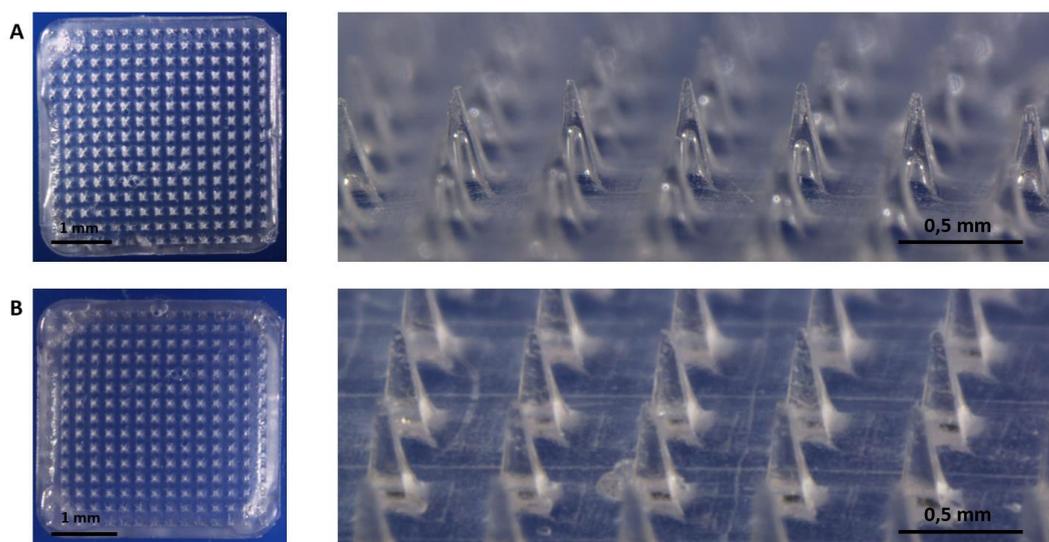
#### 3.1. Preparação e caracterização das microagulhas de pululano

As microagulhas de pululano foram preparadas por micromoldagem usando moldes de polidimetilsiloxano (PDMS) e foram estudadas duas concentrações do

polissacarídeo. De forma a determinar qual a concentração mais indicada, as microagulhas de pululano obtidas foram caracterizadas morfológica e mecanicamente.

Na Figura 12 apresentam-se as fotografias digitais das microagulhas com 10 e 20% de pululano obtidas na lupa. A observação das microagulhas na lupa mostrou que os sistemas com 10% de pululano apresentavam microagulhas ocas pois apenas as pontas se encontram preenchidas, enquanto que nos sistemas com 20% de pululano, as microagulhas estavam completamente preenchidas e com as pontas bem definidas.

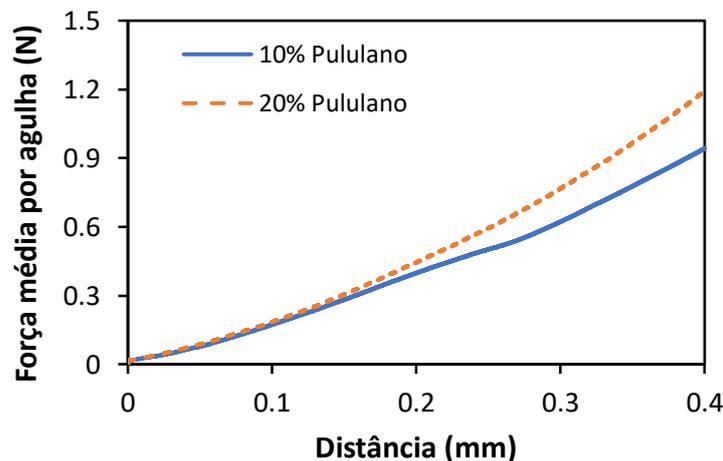
Adicionalmente, as microagulhas apresentam alturas médias de  $0,38\pm 0,03$  mm quando preparadas com 10% de pululano e  $0,43\pm 0,03$  mm com 20% de pululano. A diferença de tamanho das microagulhas para as diferentes concentrações pode ser explicada pela diferença nas concentrações das soluções usadas para a sua preparação, e, portanto, a quantidade final de polímero nas microagulhas. Tendo em conta as dimensões do molde (0,50 mm de profundidade), podemos concluir que ocorreu uma redução no tamanho das microagulhas de cerca de 24% para as preparadas com 10% de pululano e de cerca de 14% para as preparadas com 20% de pululano, o que está de acordo com os valores reportados por Fonseca *et al.*<sup>10</sup>, e pode ser justificado pela evaporação do solvente e a quantidade de pululano usado. Os sistemas preparados com a solução de 20% de pululano apresentam uma maior quantidade do polímero, o que justifica o maior tamanho das microagulhas e o seu total preenchimento com pontas bem definidas.<sup>10</sup>



**Figura 12.** Fotografias dos sistemas de microagulhas obtidas na lupa para as diferentes concentrações de pululano: (A) 10% pululano e (B) 20% pululano.

De modo a avaliar a força mecânica das microagulhas, foi realizado um teste de compressão axial. O gráfico da Figura 13 mostra-nos que o aumento da concentração de pululano promove um aumento na força mecânica das microagulhas a partir da distância de 0,2 mm. O valor de força semelhante que se verifica entre as distâncias de 0 e 0,2 mm para as duas amostras pode estar relacionada com o aspeto das microagulhas, como podemos observar na Figura 12. Para ambas as concentrações as pontas das microagulhas encontram-se preenchidas, deste modo, a força suportada pela ponta das microagulhas em ambas amostras é semelhante. No entanto, à medida que avançamos no corpo das microagulhas aquelas que não estão preenchidas (10% de pululano) suportam forças inferiores.

As microagulhas produzidas neste estudo apresentaram uma força por agulha de 0,39 N para os sistemas preparados com 10% de pululano e 0,44 N para os sistemas preparados com 20% de pululano, para o deslocamento de 0,2 mm, o que está de acordo com os resultados obtidos por Fonseca *et al.*<sup>10</sup>, que foram de 0,3 a 0,53 N por agulha para o mesmo deslocamento. Os valores obtidos estão também de acordo com o valor limite de 0,15 N por agulha reportado por Davis *et al.*<sup>117</sup> para a inserção na pele usando outras microagulhas, o que demonstra a adequação das microagulhas de pululano produzidas para a inserção na pele.



**Figura 13.** Gráfico da força por agulha (N) em função da distância (mm) para as diferentes concentrações de pululano (10% e 20% m/v).

Com base no desempenho das microagulhas preparadas com diferentes concentrações de pululano, as microagulhas com 20% de pululano apresentaram

melhores características mecânicas e morfológicas e, como tal, foram as escolhidas para avançar para a fase seguinte de incorporação das nanopartículas de ouro.

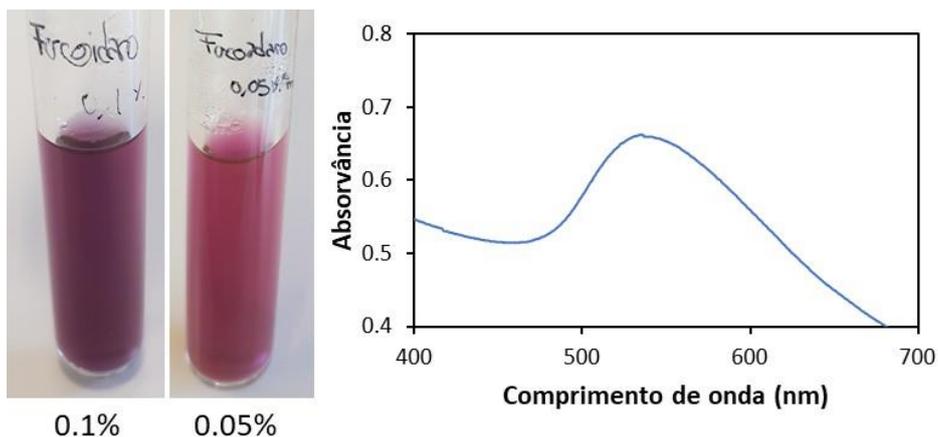
### 3.2. Síntese e caracterização das AuNPs funcionalizadas com fucoidano

A síntese das AuNPs funcionalizadas com fucoidano foi realizada recorrendo à radiação micro-ondas que permite a obtenção de AuNPs ao fim de 1 minuto de reação e com propriedades anticancerígenas, tal como reportado por Pinto *et al.*<sup>116</sup> Assim sendo, foram testadas diferentes concentrações de solução de fucoidano, nomeadamente 0,1% e 0,05 % (m/v), para estudar o seu efeito no tamanho e concentração das AuNPs.

A mudança de cor das soluções de Au de amarelo para um tom arroxeadado para a concentração de fucoidano de 0,1% e um tom avermelhado para a concentração de fucoidano de 0,05%, permite confirmar a formação das AuNPs (Figura 14A). A formação de uma cor avermelhada no caso da solução de menor concentração de fucoidano poderá estar associada à formação de nanopartículas maiores e mais agregadas devido à menor quantidade de fucoidano presente na superfície das AuNPs.<sup>116</sup>

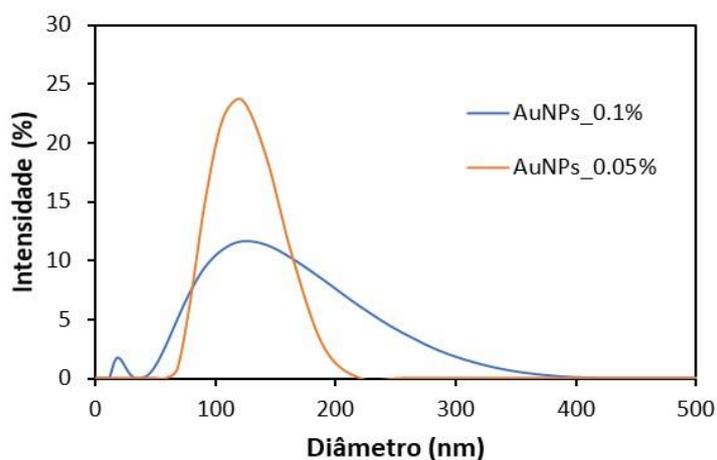
O espectro de UV-vis das AuNPs para a concentração 0,1% mostrou uma banda típica a cerca de 540 nm no espectro do visível, como podemos observar na Figura 14B, que é indicativa da formação das nanopartículas de ouro.<sup>116</sup> Nos resultados obtidos por Pinto *et al.*, o espectro das AuNPs apresenta um pico a 520 nm para a mesma concentração de fucoidano.<sup>116</sup> Um outro estudo realizado por Jang *et al.*<sup>118</sup> revelou valores de 546,5 nm para uma concentração de 0,1% de fucoidano, o que nos permite concluir que existe uma concordância dos valores obtidos com o reportado na literatura.

Adicionalmente, as soluções coloidais de AuNPs/fucoidano foram quantificadas relativamente ao elemento químico de Au por espectrometria de plasma acoplado indutivamente (ICP). Os resultados analíticos demonstraram que diferentes concentrações de fucoidano originam soluções coloidais de AuNPs/fucoidano com concentrações de Au distintas, nomeadamente de 47 mg L<sup>-1</sup> para as AuNPs sintetizadas com 0,05% de fucoidano e 181 mg L<sup>-1</sup> para as AuNPs sintetizadas com 0,1% de fucoidano. Esta diferença nas concentrações vai de encontro à intensidade de cor das respetivas soluções coloidais de AuNPs/fucoidano (Figura 14A).



**Figura 14.** (A) Fotografias digitais das soluções coloidais das AuNPs preparadas com diferentes concentrações de fucoidano (0,1 e 0,05%, m/v) e (B) espectros de UV-vis das AuNPs funcionalizadas com fucoidano para a concentração de 0,1 % m/v.

As soluções coloidais de AuNPs/fucoidano foram ainda analisadas por difusão dinâmica de luz (DLS) para determinar o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, os quais rondaram os 130 nm e 112 nm para as AuNPs sintetizadas com 0,05% e 0,1% de fucoidano, respectivamente. Os valores obtidos confirmam o aumento do tamanho das nanopartículas, com a diminuição da concentração de fucoidano. Embora estes valores sejam superiores aos reportados, por exemplo, por Jang *et al.*<sup>118</sup>, que após análise por DLS, obtiveram valores de 75 nm para uma concentração de 0,1% de fucoidano, a tendência de aumento do tamanho das AuNPs com a redução da concentração de fucoidano está de acordo com literatura, nomeadamente com o estudo de Pinto *et al.*<sup>116</sup>



**Figura 15.** Análise de DLS da distribuição de tamanhos das nanopartículas de ouro (AuNPs) sintetizadas com 0,1 e 0,05% (m/v) de fucoidano.

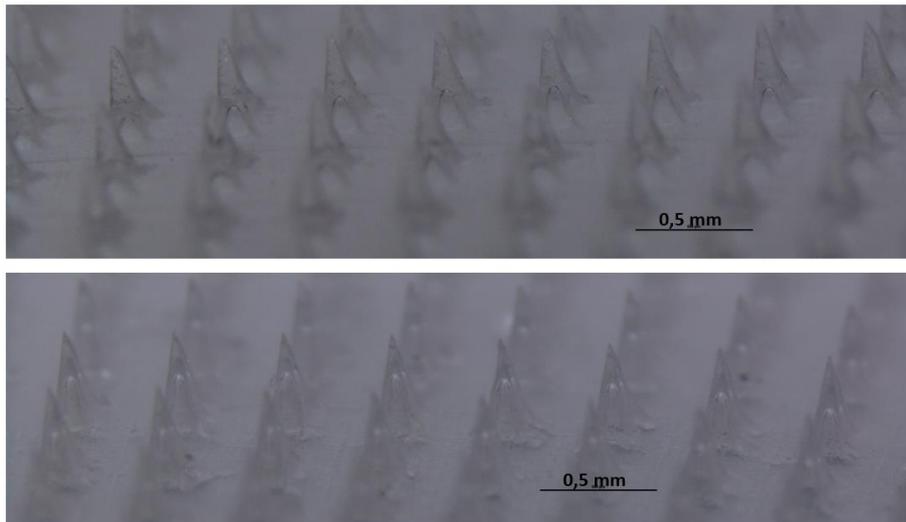
Com base no tamanho e quantidade das AuNPs, as nanopartículas sintetizadas com 0.1% (m/v) de fucoidano, que possuem tamanho menor e uma maior concentração de ouro, foram as escolhidas para serem incorporadas nas microagulhas de pululano.

### **3.3. Preparação e caracterização das microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano**

Após a otimização da concentração de pululano na produção das microagulhas biopoliméricas, bem como da concentração de fucoidano na síntese por micro-ondas das AuNPs funcionalizadas, o próximo passo centrou-se na incorporação do sistema AuNPs/fucoidano na formulação das microagulhas (Figura 11) como agente anticancerígeno para o tratamento de melanoma. As microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano preparadas a partir de uma solução de pululano a 20% (m/v) e fucoidano a 0.1% (m/v), foram caracterizadas no que diz respeito à sua morfologia, desempenho mecânico e capacidade de inserção num modelo de pele. Adicionalmente, o seu potencial citotóxico foi avaliado nas linhas celulares HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados e não cancerígenos) e A375 (células de melanoma humano).

#### **3.3.1. Análise morfológica**

As microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano, preparadas igualmente por micromoldagem, foram analisadas na lupa para verificar a sua morfologia. Na Figura 16 apresentam-se as fotografias digitais das microagulhas, nas quais é possível verificar a presença de algumas microagulhas ocas, em que apenas as pontas se encontram preenchidas. Este comportamento pode ser explicado possivelmente pelo aumento de viscosidade da solução de pululano bem como pela evaporação do solvente de forma não-uniforme, após a incorporação das AuNPs/fucoidano, mas também pela ineficiente remoção das bolhas de ar durante o processo de micromoldagem.

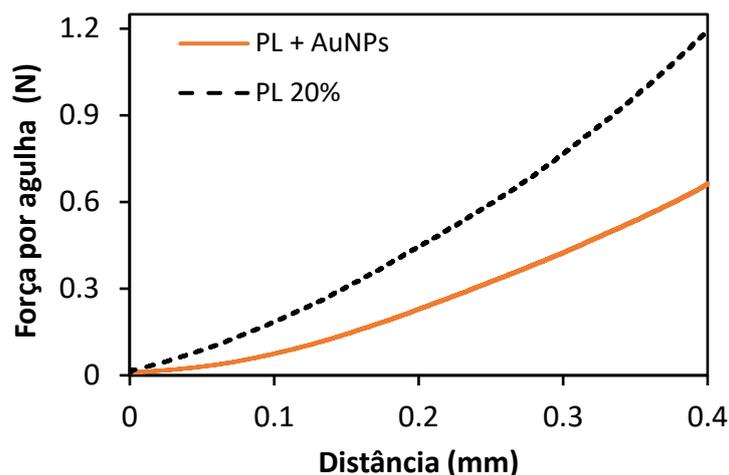


**Figura 16.** Fotografias digitais das microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano obtidas na lupa.

### 3.3.2. Análise mecânica

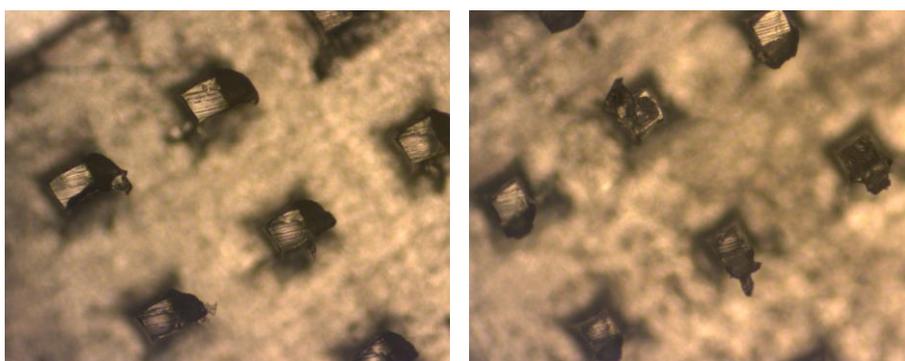
Relativamente ao desempenho mecânico, as microagulhas devem resistir à inserção na pele sem quebrar ou entortar, permitindo a aplicação de ingredientes ativos nas camadas mais profundas da pele e atingir a corrente sanguínea. De modo a avaliar a força mecânica das microagulhas, foi realizado um teste de compressão axial.

Na Figura 17 é possível comparar a força suportada pelas microagulhas de pululano funcionalizadas com AuNPs/fucoidano e as correspondentes microagulhas só de pululano (20% m/v). A disparidade na força suportada pelas microagulhas estudadas pode estar relacionada com a diferença no seu aspeto morfológico, ou seja, o facto de algumas microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano estarem ocas pode ser a razão de suportarem uma força menor do que as microagulhas de pululano. Ainda assim, as microagulhas produzidas apresentaram uma força por agulha de 0,22 N para o deslocamento de 0,2 mm, que é superior ao valor limite de 0,15 N por agulha relatado por Davis *et al.*<sup>117</sup> para a inserção na pele usando microagulhas, o que demonstra que este sistema de microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano é adequado para a inserção na pele.



**Figura 17.** Gráfico da força por agulha (N) em função da distância (mm) para as microagulhas de pululano (20%, m/v) e para as microagulhas de pululano funcionalizadas com AuNPs/fucoidano.

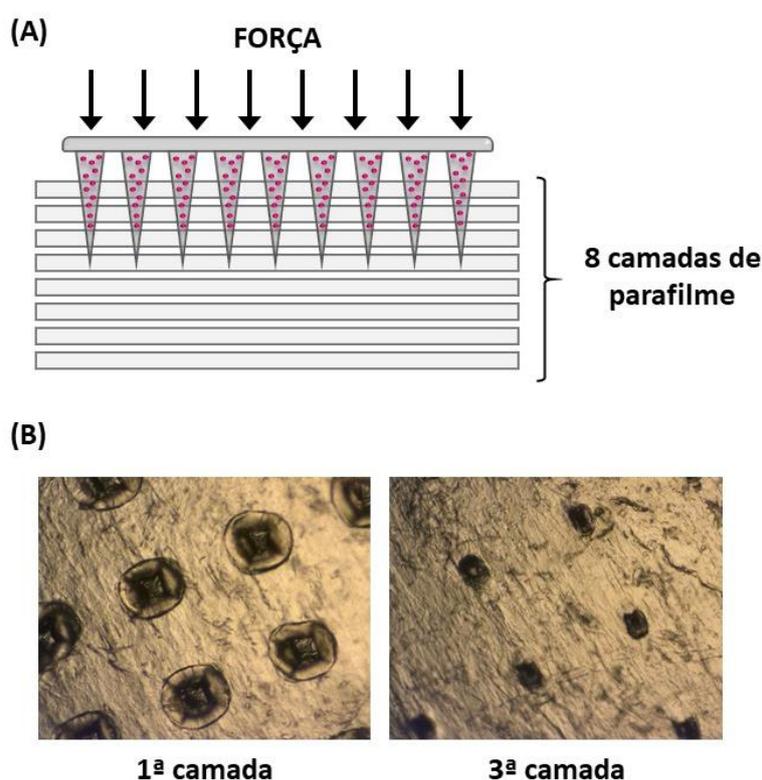
Na Figura 18 podemos observar o comportamento das microagulhas após a realização do teste de compressão axial. Quando se realizou este teste com as microagulhas de pululano verificou-se que estas apresentavam as pontas dobradas, o que está de acordo com os resultados obtidos por Vora *et al.*<sup>11</sup> No caso das microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano, as suas pontas, após o teste mecânico, encontravam-se quebradas ou esmagadas. Isto é também justificado pelo facto de estas agulhas estarem ocas, resistindo menos à aplicação de uma força com igual valor.



**Figura 18.** Fotografias dos sistemas de microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano obtidas no microscópio ótico (ampliação: 25×) após a realização do teste mecânico de compressão.

### 3.3.3. Inserção no modelo de parafilme

A capacidade de inserção na pele das microagulhas foi investigada numa configuração de modelo de pele composta por oito camadas de parafilme (Figura 19A), onde uma força média de 40 N foi aplicada a cada sistema durante 30 segundos.<sup>119</sup> As microagulhas perfuraram a primeira, a segunda e a terceira camadas de parafilme (Figura 19B). A terceira camada corresponde a uma profundidade de penetração de 381  $\mu\text{m}$ , o que indica que as microagulhas conseguem atingir a derme cutânea (Figura 3).



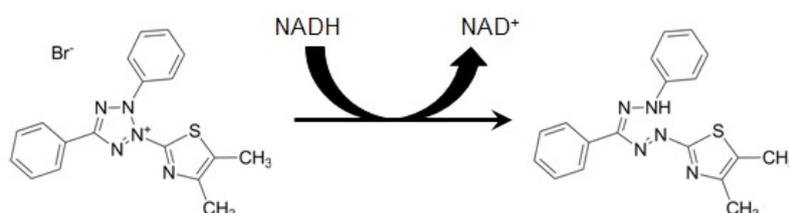
**Figura 19.** (A) Esquema da inserção das microagulhas nas das 8 camadas de parafilme, e (B) micrografias óticas (ampliação: 25 $\times$ ) da 1ª e 3ª camadas de parafilme após os testes de inserção das microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano.

Estes resultados estão de acordo com o que foi reportado por Fonseca *et al.*<sup>10</sup>, relativamente à inserção de microagulhas de pululano num modelo de parafilme semelhante. Num estudo realizado por Pan *et al.*<sup>95</sup>, em que utilizaram microagulhas solúveis de HA, após a realização do teste de inserção no parafilme, foi possível concluir que as agulhas conseguem penetrar até uma profundidade de, aproximadamente, 330  $\mu\text{m}$ , conseguindo assim atingir a zona onde estão localizadas as células do melanoma. Isto permite concluir que, apesar das microagulhas apresentarem uma estrutura oca,

conseguem, ainda assim, penetrar a camada basal epidérmica e a derme superior, atingindo desta forma o local onde estão localizadas as células do melanoma pretendidas. Contudo, a otimização da produção das microagulhas de pululano com AuNPs funcionalizadas com fucoidano deve ser considerada no futuro para ultrapassar esta limitação e evitar variabilidade nas propriedades das microagulhas.

### 3.3.4. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

O efeito das microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano na viabilidade celular das linhas celulares HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados e não cancerígenos) e A375 (células de melanoma humano) foi avaliado pelo ensaio do MTT. Este é um teste colorimétrico baseado na conversão do MTT num composto de coloração roxa, ou seja, o formazano (Figura 20), pelas células viáveis, sendo a quantidade de formazano usada para a quantificar a atividade metabólica das células (ISO 10993-5:2009(E)). As linhas celulares HaCaT e A375 foram selecionadas por serem, respetivamente, uma linha celular não tumoral e uma linha celular de melanoma humano. Adicionalmente, a linha celular de melanoma humano foi também escolhida com base em estudos anteriores que demonstraram que o sistema AuNPs/fucoidano possui potencial anticancerígeno relativamente a células de melanoma humano.<sup>116</sup>

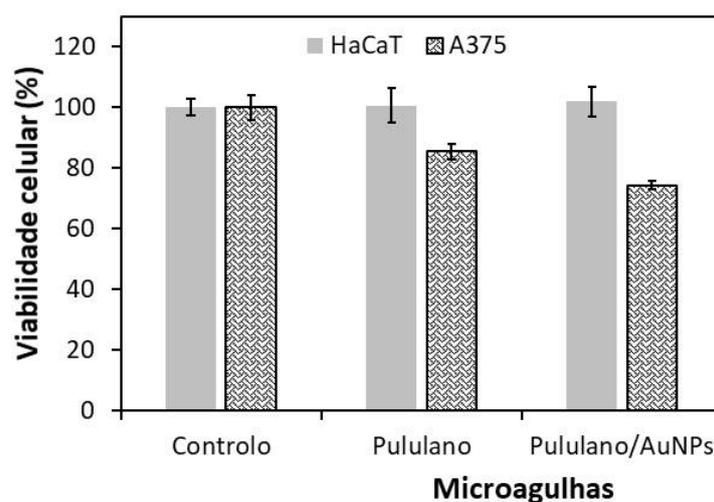


**Figura 20.** Esquema reacional da transformação do MTT em formazano (ISO 10993-5:2009(E)).

A Figura 21 evidencia os resultados da viabilidade celular para os sistemas de microagulhas de pululano e pululano/AuNPs/fucoidano, para um tempo de exposição de 24 h. Como era expectável, foram obtidos valores de crescimento celular normais para o controlo, ou seja, 100% de viabilidade celular. Adicionalmente, ambos os sistemas de microagulhas apresentam-se não citotóxicos para as células HaCaT, dado que a viabilidade celular se manteve nos 100%. Contudo, no caso das células A375, a exposição

aos dois sistemas de microagulhas originou uma redução da viabilidade celular para valores de  $85,4 \pm 1,3\%$  (microagulhas de pululano) e  $74,3 \pm 2,5\%$  (microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano). Embora estes valores estejam dentro do intervalo considerado não-citotóxico, ou seja, um determinado material é considerado citotóxico quando a viabilidade celular é diminuída em mais de 30% (ISO 10993-5:209(E)), esta redução indica que a presença de AuNPs/fucoidano nas microagulhas de pululano influencia a viabilidade celular das células de melanoma humano.

Estudos anteriores reportaram que o potencial anticancerígeno do sistema AuNPs/fucoidano relativamente a células de melanoma humano é dependente da concentração.<sup>116</sup> Assim sendo, o aumento da concentração das AuNPs/fucoidano nas microagulhas irá promover certamente uma resposta citotóxica superior nas células A375. Apesar dos resultados serem promissores, será necessário testar outras concentrações de AuNPs/fucoidano e tempos de exposição, a fim de provar que o sistema de microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano possui potencial anticancerígeno.



**Figura 21.** Viabilidade celular (%) das células HaCaT e A375 quando expostas às amostras de microagulhas de pululano e pululano/AuNPs/fucoidano durante 24 h.

## 4. Conclusões e trabalho futuro

Neste trabalho desenvolveram-se microagulhas solúveis de pululano funcionalizadas com AuNPs/fucoidano para potencial aplicação no tratamento de cancro da pele. Começou por se realizar a otimização da concentração de pululano, que permitiu depreender que quanto maior for a concentração de pululano, maior será a força mecânica das microagulhas e o seu aspeto morfológico. Assim sendo, a concentração escolhida foi de 20% m/v de pululano. O passo seguinte passou pela síntese das nanopartículas de ouro funcionalizadas com fucoidano recorrendo à radiação micro-ondas, em que foram testadas diferentes concentrações de solução de fucoidano, nomeadamente 0,1% e 0,05 % m/v, para estudar o seu efeito no tamanho e concentração de AuNPs. A solução de 0,1% m/v de fucoidano permitiu a obtenção de partículas com um tamanho menor, sendo por isso, a solução escolhida para incorporar nas microagulhas de pululano.

As microagulhas de pululano funcionalizadas com AuNPs/fucoidano, preparadas por micromoldagem, apresentavam-se ocas, ao contrário dos sistemas preparados apenas com pululano, o que justifica o facto de, mecanicamente, suportarem valores de força inferiores. Ainda assim, estes sistemas de microagulhas conseguem penetrar a barreira do estrato córneo, o que é bastante positivo. Adicionalmente, a citotoxicidade *in vitro* das microagulhas foi avaliada nas linhas celulares HaCaT (queratinócitos humanos) e A375 (células de melanoma humano) ao fim de 24 h. Os resultados mostraram que as microagulhas de pululano/AuNPs/fucoidano não são citotóxicas para as células HaCaT, dado que a viabilidade celular se manteve nos 100%, no entanto, a viabilidade celular das células A375 reduziu para  $74,3 \pm 2,5\%$ . Esta diminuição é indicadora de que as microagulhas possuem uma certa toxicidade celular para as células de melanoma, e, por conseguinte, aumentar a concentração das AuNPs/fucoidano promoverá seguramente uma resposta citotóxica mais elevada nas células cancerígenas. Os resultados alcançados nesta dissertação comprovam então a potencialidade destes sistemas de microagulhas de pululano/AuNPs/ fucoidano para o tratamento não invasivo de cancro da pele.

Como passos seguintes no trabalho será fundamental otimizar a produção das microagulhas com nanopartículas de ouro (para aumentar a sua uniformidade) e ajustar a sua composição em termos da quantidade de AuNPs por forma a melhorar a sua atividade anticancerígena. O estudo destes sistemas de microagulhas no tratamento do melanoma por fototerapia (conjugando a atividade antitumoral do fucoidano com as propriedades

das AuNPs por fototerapia) será também uma abordagem interessante para aumentar a eficiência destes sistemas. Será também primordial testar a inserção e a sua capacidade de entrega de fármacos *in vitro* usando modelos de pele humana ou animal e, posteriormente *in vivo*, de forma a demonstrar que estes sistemas de microagulhas têm potencial para serem utilizadas no tratamento de pacientes com melanoma.

## 5. Bibliografia

- (1) Swart, H.; Breytenbach, J. C.; Hadgraft, J.; Du Plessis, J. Synthesis and Transdermal Penetration of NSAID Glycoside Esters. *Int. J. Pharm.* **2005**, *301* (1–2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.030>.
- (2) Badran, M. M.; Kuntsche, J.; Fahr, A. Skin Penetration Enhancement by a Microneedle Device (Dermaroller®) in Vitro: Dependency on Needle Size and Applied Formulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *36* (4–5), 511–523. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.12.008>.
- (3) Tuan-Mahmood, T. M.; McCrudden, M. T. C.; Torrisi, B. M.; McAlister, E.; Garland, M. J.; Singh, T. R. R.; Donnelly, R. F. Microneedles for Intradermal and Transdermal Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *50* (5), 623–637. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.05.005>.
- (4) Ashraf, M. W.; Tayyaba, S.; Afzulpurkar, N. Micro Electromechanical Systems (MEMS) Based Microfluidic Devices for Biomedical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12* (6), 3648–3704. <https://doi.org/10.3390/ijms12063648>.
- (5) Wang, M.; Hu, L.; Xu, C. Recent Advances in the Design of Polymeric Microneedles for Transdermal Drug Delivery and Biosensing. *Lab Chip* **2017**, *17* (8), 1373–1387. <https://doi.org/10.1039/C7LC00016B>.
- (6) Fonseca, D. F. S.; Vilela, C.; Silvestre, A. J. D.; Freire, C. S. R. A Compendium of Current Developments on Polysaccharide and Protein-Based Microneedles. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *136*, 704–728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.163>.
- (7) Singh, R. S.; Kaur, N.; Rana, V.; Kennedy, J. F. Pullulan: A Novel Molecule for Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *171*, 102–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.089>.
- (8) Kimoto, T.; Shibuya, T.; Shiobara, S. Safety Studies of a Novel Starch, Pullulan: Chronic Toxicity in Rats and Bacterial Mutagenicity. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35* (3–4), 323–329. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00001-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00001-X).
- (9) Dong, X.; Duan, X.; Sun, Z.; Zhang, X.; Li, C.; Yang, S.; Ren, B.; Zheng, S.; Dionysiou, D. D. Jo Ur l P Ro Of. *Applied Catal. B, Environ.* **2019**, 118214. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.118214>.
- (10) Fonseca, D. F. S.; Costa, P. C.; Almeida, I. F.; Dias-Pereira, P.; Correia-Sá, I.; Bastos, V.; Oliveira, H.; Duarte-Araújo, M.; Morato, M.; Vilela, C.; Silvestre, A.

- J. D.; Freire, C. S. R. Pullulan Microneedle Patches for the Efficient Transdermal Administration of Insulin Envisioning Diabetes Treatment. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *241* (April), 116314. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116314>.
- (11) Vora, L. K.; Courtenay, A. J.; Tekko, I. A.; Larrañeta, E.; Donnelly, R. F. Pullulan-Based Dissolving Microneedle Arrays for Enhanced Transdermal Delivery of Small and Large Biomolecules. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *146*, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.184>.
- (12) Menon, J. U.; Jadeja, P.; Tambe, P.; Vu, K.; Yuan, B.; Nguyen, K. T. Nanomaterials for Photo-Based Diagnostic and Therapeutic Applications. *Theranostics* **2013**, *3* (3), 152–166. <https://doi.org/10.7150/thno.5327>.
- (13) Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (5), 2739–2779. <https://doi.org/10.1021/cr2001178>.
- (14) Abadeer, N. S.; Murphy, C. J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (9), 4691–4716. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11232>.
- (15) Her, S.; Jaffray, D. A.; Allen, C. Gold Nanoparticles for Applications in Cancer Radiotherapy: Mechanisms and Recent Advancements. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *109*, 84–101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.012>.
- (16) Mieszawska, A. J.; Mulder, W. J. M.; Fayad, Z. A.; Cormode, D. P. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (3), 831–847. <https://doi.org/10.1021/mp3005885>.
- (17) Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Delivery Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (11), 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>.
- (18) Online, V. 2008 Gold : Chemistry , Materials and Catalysis Issue Please Take a Look at the Full Table of Contents to Access The. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (9), 1909–1930. <https://doi.org/10.1039/b712170a>.
- (19) Yadav, P.; Singh, S. P.; Rengan, A. K.; Shanavas, A.; Srivastava, R. Gold Laced Bio-Macromolecules for Theranostic Application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *110*, 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.124>.
- (20) Wu, L.; Sun, J.; Su, X.; Yu, Q.; Yu, Q.; Zhang, P. A Review about the Development of Fucoidan in Antitumor Activity: Progress and Challenges. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *154*, 96–111.

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.005>.
- (21) Atashrazm, F.; Lowenthal, R. M.; Woods, G. M.; Holloway, A. F.; Dickinson, J. L. Fucoidan and Cancer: A Multifunctional Molecule with Anti-Tumor Potential. *Mar. Drugs* **2015**, *13* (4), 2327–2346. <https://doi.org/10.3390/md13042327>.
  - (22) Kwak, J. Y. Fucoidan as a Marine Anticancer Agent in Preclinical Development. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (2), 851–870. <https://doi.org/10.3390/md12020851>.
  - (23) Saldanha, G.; Potter, L.; DaForno, P.; Pringle, J. H. Cutaneous Melanoma Subtypes Show Different BRAF and NRAS Mutation Frequencies. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12* (15), 4499–4505. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2447>.
  - (24) Lin, J. Y.; Fisher, D. E. Melanocyte Biology and Skin Pigmentation. *Nature* **2007**, *445*, 843.
  - (25) Davids, L. M.; Kleem, B. The Menace of Melanoma: A Photodynamic Approach to Adjunctive Cancer Therapy. *Melanoma - From Early Detect. to Treat.* **2013**. <https://doi.org/10.5772/53676>.
  - (26) Riker, A. I. *Melanoma: A Modern Multidisciplinary Approach*; Riker, A. I., Ed.; Springer, Cham.
  - (27) MacKie, R. M.; Hauschild, A.; Eggermont, A. M. M. Epidemiology of Invasive Cutaneous Melanoma. *Ann. Oncol.* **2009**, *20* (SUPPL. 4), 1–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp252>.
  - (28) Gudbjartsson, D. F.; Sulem, P.; Stacey, S. N.; Goldstein, A. M.; Rafnar, T.; Sigurgeirsson, B.; Benediktsdottir, K. R.; Thorisdottir, K.; Ragnarsson, R.; Sveinsdottir, S. G.; Magnusson, V.; Lindblom, A.; Kostulas, K.; Botella-Estrada, R.; Soriano, V.; Juberías, P.; Grasa, M.; Saez, B.; Andres, R.; Scherer, D.; Rudnai, P.; Gurzau, E.; Koppova, K.; Kiemeny, L. A.; Jakobsdottir, M.; Steinberg, S.; Helgason, A.; Gretarsdottir, S.; Tucker, M. A.; Mayordomo, J. I.; Nagore, E.; Kumar, R.; Hansson, J.; Olafsson, J. H.; Gulcher, J.; Kong, A.; Thorsteinsdottir, U.; Stefansson, K. ASIP and TYR Pigmentation Variants Associate with Cutaneous Melanoma and Basal Cell Carcinoma. *Nat. Genet.* **2008**, *40* (7), 886–891. <https://doi.org/10.1038/ng.161>.
  - (29) Kassem, A.; Schöpflin, A.; Diaz, C.; Weyers, W.; Stickeler, E.; Werner, M.; Zur Hausen, A. Frequent Detection of Merkel Cell Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinomas and Identification of a Unique Deletion in the VP1 Gene. *Cancer Res.* **2008**, *68* (13), 5009–5013. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0949>.
  - (30) Livingstone, E.; Kochs, C.; Schadendorf, D. *Handbook of Cutaneous Melanoma:*

*A Guide to Diagnosis and Treatment*; Springer Healthcare, 2013.

- (31) Sanlorenzo, M.; Wehner, M. R.; Linos, E.; Kornak, J.; Kainz, W.; Posch, C.; Vujic, I.; Johnston, K.; Gho, D.; Monico, G.; McGrath, J. T.; Osella-Abate, S.; Quaglino, P.; Cleaver, J. E.; Ortiz-Urda, S. The Risk of Melanoma in Airline Pilots and Cabin Crew: A Meta-Analysis. *JAMA Dermatology* **2015**, *151* (1), 51–58. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.1077>.
- (32) Forman, S. B.; Ferringer, T. C.; Peckham, S. J.; Dalton, S. R.; Sasaki, G. T.; Libow, L. F.; Elston, D. M. Is Superficial Spreading Melanoma Still the Most Common Form of Malignant Melanoma? *J. Am. Acad. Dermatol.* **2008**, *58* (6), 1013–1020. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.10.650>.
- (33) Clark, W. H.; From, L.; Bernardino, E. A.; Mihm, M. C. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Res.* **1969**, *29* (3), 705–727.
- (34) Menzies, S. W.; Moloney, F. J.; Byth, K.; Avramidis, M.; Argenziano, G.; Zalaudek, I.; Braun, R. P.; Malvehy, J.; Puig, S.; Rabinovitz, H. S.; Oliviero, M.; Cabo, H.; Bono, R.; Pizzichetta, M. A.; Claeson, M.; Gaffney, D. C.; Soyer, H. P.; Stanganelli, I.; Scolyer, R. A.; Guitera, P.; Kelly, J.; McCurdy, O.; Llambrich, A.; Marghoob, A. A.; Zaballos, P.; Kirchesch, H. M.; Piccolo, D.; Bowling, J.; Thomas, L.; Terstappen, K.; Tanaka, M.; Pellacani, G.; Pagnanelli, G.; Ghigliotti, G.; Ortega, B. C.; Crafte, G.; Perusquía Ortiz, A. M.; Tromme, I.; Karaarslan, I. K.; Ozdemir, F.; Tam, A.; Landi, C.; Norton, P.; Kaçar, N.; Rudnicka, L.; Slowinska, M.; Simionescu, O.; Di Stefani, A.; Coates, E.; Kreusch, J. Dermoscopic Evaluation of Nodular Melanoma. *JAMA Dermatology* **2013**, *149* (6), 699–709. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.2466>.
- (35) Kvaskoff, M.; Siskind, V.; Green, A. C. Risk Factors for Lentigo Maligna Melanoma Compared with Superficial Spreading Melanoma: A Case-Control Study in Australia. *Arch. Dermatol.* **2012**, *148* (2), 164–170. <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2011.291>.
- (36) McKenna, J. K.; Florell, S. R.; Goldman, G. D.; Bowen, G. M. Lentigo Maligna/Lentigo Maligna Melanoma: Current State of Diagnosis and Treatment. *Dermatologic Surg.* **2006**, *32* (4), 493–504. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2006.32102.x>.
- (37) Bristow, I. R.; Acland, K. Acral Lentiginous Melanoma of the Foot and Ankle: A Case Series and Review of the Literature. *J. Foot Ankle Res.* **2008**, *1* (1), 1–5.

- <https://doi.org/10.1186/1757-1146-1-11>.
- (38) Goydos, J. S.; Shoen, S. L. Acral Lentiginous Melanoma. *Cancer Treat. Res.* **2016**, *167* (4), 321–329. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5_14).
- (39) Phan, A.; Touzet, S.; Dalle, S.; Ronger-Savlé, S.; Balme, B.; Thomas, L. Acral Lentiginous Melanoma: Histopathological Prognostic Features of 121 Cases. *Br. J. Dermatol.* **2007**, *157* (2), 311–318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08031.x>.
- (40) Atallah, E.; Flaherty, L. Treatment of Metastatic Malignant Melanoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2005**, *6* (3), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s11864-005-0002-5>.
- (41) Tsao, H.; Atkins, M. B.; Sober, A. J. Management of Cutaneous Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351* (10), 998–1012. <https://doi.org/10.1056/NEJMra041245>.
- (42) Gradishar, W. J.; Anderson, B. O.; Balassanian, R.; Blair, S. L.; Burstein, H. J.; Cyr, A.; Elias, A. D.; Farrar, W. B.; Forero, A.; Giordano, S. H.; Goetz, M. P.; Goldstein, L. J.; Isakoff, S. J.; Lyons, J.; Kelly Marcom, P.; Mayer, I. A.; McCormick, B.; Moran, M. S.; O'Regan, R. M.; Patel, S. A.; Pierce, L. J.; Reed, E. C.; Salerno, K. E.; Schwartzberg, L. S.; Sitapati, A.; Smith, K. L.; Smith, M. Lou; Soliman, H.; Somlo, G.; Telli, M. L.; Ward, J. H.; Kumar, R.; Shead, D. A. Clinical Practice Guidelines in Oncology. *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **2018**, *16* (3), 310–320. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0012>.
- (43) Domingues, B.; Lopes, J.; Soares, P.; Populo, H. Melanoma Treatment in Review. *ImmunoTargets Ther.* **2018**, *Volume 7*, 35–49. <https://doi.org/10.2147/itt.s134842>.
- (44) Bhatia, S.; Tykodi, S. S.; Thompson, J. A. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. *Oncology* **2009**, *23* (6), 488–496.
- (45) Lugowska, I.; Teterycz, P.; Rutkowski, P. Immunotherapy of Melanoma. *Wspolczesna Onkol.* **2017**, *2* (1A), 61–67. <https://doi.org/10.5114/wo.2018.73889>.
- (46) Moses, M. A.; Brem, H.; Langer, R. Advancing the Field of Drug Delivery: Taking Aim at Cancer. *Cancer Cell* **2003**, *4* (5), 337–341. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00276-9](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00276-9).
- (47) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science*. March 19, 2004, pp 1818–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>.
- (48) Tiwari, G.; Tiwari, R.; Bannerjee, S.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P.; Sriwastawa, B. Drug Delivery Systems: An Updated Review. *Int. J. Pharm. Investig.* **2012**, *2* (1), 2. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.96920>.

- (49) Teichmann, A.; Heuschkel, S.; Jacobi, U.; Presse, G.; Neubert, R. H. H.; Sterry, W.; Lademann, J. Comparison of Stratum Corneum Penetration and Localization of a Lipophilic Model Drug Applied in an o/w Microemulsion and an Amphiphilic Cream. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *67* (3), 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.04.006>.
- (50) Saravanakumar, K.; Swapna, P.; Nagaveni, P.; Vani, P.; Pujitha, K. Transdermal Drug Delivery System: A Review. *J. Glob. Trends Pharm. Sci.* **2015**, *6* (1), 2485–2490. <https://doi.org/10.33786/jcpr.2010.v01i01.015>.
- (51) Arunachalam, A.; Karthikeyan, M.; Kumar, D. V.; Prathap, M.; Sethuraman, S.; Ashutoshkumar, S. Review Article Current Pharma Research Transdermal Drug Delivery System : A Review. *Micro* **2010**, *1* (1).
- (52) Pastore, M. N.; Kalia, Y. N.; Horstmann, M.; Roberts, M. S. Transdermal Patches: History, Development and Pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (9), 2179–2209. <https://doi.org/10.1111/bph.13059>.
- (53) Wokovich, A. M.; Prodduturi, S.; Doub, W. H.; Hussain, A. S.; Buhse, L. F. Transdermal Drug Delivery System (TDDS) Adhesion as a Critical Safety, Efficacy and Quality Attribute. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *64* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.03.009>.
- (54) Da Silva, J. A.; Apolinário, A. C.; Souza, M. S. R.; Damasceno, B. P. G. L.; Medeiros, A. C. D. Administração Cutânea de Fármacos: Desafios e Estratégias Para o Desenvolvimento de Formulações Transdérmicas. *Rev. Ciências Farm. Basica e Apl.* **2010**, *31* (3), 125–131.
- (55) Brain, K. R.; Green, D. M.; Lalko, J.; Api, A. M. In-Vitro Human Skin Penetration of the Fragrance Material Geranyl Nitrile. *Toxicol. Vitro.* **2007**, *21* (1), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.08.005>.
- (56) Marjukka Suhonen, T.; A. Bouwstra, J.; Urtti, A. Chemical Enhancement of Percutaneous Absorption in Relation to Stratum Corneum Structural Alterations. *J. Control. Release* **1999**, *59* (2), 149–161. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00187-4).
- (57) Sinha, V. R.; Kaur, M. P. Permeation Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, *26* (11), 1131–1140. <https://doi.org/10.1081/DDC-100100984>.
- (58) Hadgraft, J. Passive Enhancement Strategies in Topical and Transdermal Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **1999**, *184* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/S0378->

5173(99)00095-2.

- (59) Alkilani, A. Z.; McCrudden, M. T. C.; Donnelly, R. F. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics* **2015**, *7* (4), 438–470. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438>.
- (60) Simon, L.; Weltner, A. N.; Wang, Y.; Michniak, B. A Parametric Study of Iontophoretic Transdermal Drug-Delivery Systems. *J. Memb. Sci.* **2006**, *278* (1–2), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.10.049>.
- (61) Chorilli, M.; Pesquisa, A. De. De Liberação de Fármacos. **2007**, *88* (1), 7–13.
- (62) De Oliveira, A. G.; Scarpa, M. V.; Correa, M. A.; Rodrigues Cera, L. F.; Formariz, T. P. Microemulsões: Estrutura e Aplicações Como Sistema de Liberação de Fármacos. *Quim. Nova* **2004**, *27* (1), 131–138.
- (63) Silva, J.; Santana, D.; Bedor, D.; Borba, V.; Lira, A.; Egito, E. Estudo de Liberação e Permeação in Vitro Do Doclorofenaco de Dietilamônio Em Microemulsão Gel-Like. *Quim. Nova* **2009**, *32* (6), 1389–1393.
- (64) Purdon, C. H.; Haigh, J. M.; Surber, C.; Smith, E. W. Foam Drug Delivery in Dermatology. *Am. J. Drug Deliv.* **2003**, *1* (1), 71–75. <https://doi.org/10.2165/00137696-200301010-00006>.
- (65) Demir, Y. K.; Akan, Z.; Kerimoglu, O. Characterization of Polymeric Microneedle Arrays for Transdermal Drug Delivery. *PLoS One* **2013**, *8* (10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077289>.
- (66) McAllister, D. V.; Wang, P. M.; Davis, S. P.; Park, J. H.; Canatella, P. J.; Allen, M. G.; Prausnitz, M. R. Microfabricated Needles for Transdermal Delivery of Macromolecules and Nanoparticles: Fabrication Methods and Transport Studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (SUPPL. 2), 13755–13760. <https://doi.org/10.1073/pnas.2331316100>.
- (67) Bariya, S. H.; Gohel, M. C.; Mehta, T. A.; Sharma, O. P. Microneedles: An Emerging Transdermal Drug Delivery System. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *64* (1), 11–29. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01369.x>.
- (68) Prausnitz, M. R. Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.023>.
- (69) Larrañeta, E.; Lutton, R. E. M.; Woolfson, A. D.; Donnelly, R. F. Microneedle Arrays as Transdermal and Intradermal Drug Delivery Systems: Materials Science, Manufacture and Commercial Development. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2016**, *104*,

- 1–32. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2016.03.001>.
- (70) Henry, S.; McAllister, D. V.; Allen, M. G.; Prausnitz, M. R. Microfabricated Microneedles: A Novel Approach to Transdermal Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87* (8), 922–925. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/js980042+>.
- (71) Fonseca, D. F. S.; Vilela, C.; Silvestre, A. J. D.; Freire, C. S. R. A Compendium of Current Developments on Polysaccharide and Protein-Based Microneedles. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *136*, 704–728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.163>.
- (72) Waseem Ashraf, M.; Tayyaba, S.; Afzulpurkar, N.; Nisar, A. Fabrication and Analysis of Tapered Tip Silicon Microneedles for MEMS Based Drug Delivery System. *Sensors and Transducers* **2010**, *122* (11), 158–172.
- (73) Ashraf, M. W.; Tayyaba, S.; Nisar, A.; Afzulpurkar, N.; Bodhale, D. W.; Lomas, T.; Poyai, A.; Tuantranont, A. Design, Fabrication and Analysis of Silicon Hollow Microneedles for Transdermal Drug Delivery System for Treatment of Hemodynamic Dysfunctions. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *12* (11), 158–172. <https://doi.org/10.1007/s10558-010-9100-5>.
- (74) Wilke, N.; Hibert, C.; O'Brien, J.; Morrissey, A. Silicon Microneedle Electrode Array with Temperature Monitoring for Electroporation. *Sensors Actuators, A Phys.* **2005**, *123–124*, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2005.05.017>.
- (75) Donnelly, R. F.; Raj Singh, T. R.; Woolfson, A. D. Microneedle-Based Drug Delivery Systems: Microfabrication, Drug Delivery, and Safety. *Drug Deliv.* **2010**, *17* (4), 187–207. <https://doi.org/10.3109/10717541003667798>.
- (76) Ambrose, C. G.; Clanton, T. O. Bioabsorbable Implants: Review of Clinical Experience in Orthopedic Surgery. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, *32* (1), 171–177. <https://doi.org/10.1023/B:ABME.0000007802.59936.fc>.
- (77) Choi, S. O.; Kim, Y. C.; Park, J. H.; Hutcheson, J.; Gill, H. S.; Yoon, Y. K.; Prausnitz, M. R.; Allen, M. G. An Electrically Active Microneedle Array for Electroporation. *Biomed. Microdevices* **2010**, *12* (2), 263–273. <https://doi.org/10.1007/s10544-009-9381-x>.
- (78) Pérennès, F.; Marmioli, B.; Matteucci, M.; Tormen, M.; Vaccari, L.; Di Fabrizio, E. Sharp Beveled Tip Hollow Microneedle Arrays Fabricated by LIGA and 3D Soft Lithography with Polyvinyl Alcohol. *J. Micromechanics Microengineering* **2006**, *16* (3), 473–479. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/3/001>.
- (79) DeMuth, P. C.; Min, Y.; Huang, B.; Kramer, J. A.; Miller, A. D.; Barouch, D. H.;

- Hammond, P. T.; Irvine, D. J. Polymer Multilayer Tattooing for Enhanced DNA Vaccination. *Nat. Mater.* **2013**, *12* (4), 367–376. <https://doi.org/10.1038/nmat3550>.
- (80) Gill, H. S.; Prausnitz, M. R. Coating Formulations for Microneedles. *Pharm. Res.* **2007**, *24* (7), 1369–1380. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9286-4>.
- (81) Gill, H. S.; Prausnitz, M. R. Coated Microneedles for Transdermal Delivery. *J. Control. Release* **2007**, *117* (2), 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.10.017>.
- (82) Donnelly, R. F.; Singh, T. R. R.; Garland, M. J.; Migalska, K.; Majithiya, R.; McCrudden, C. M.; Kole, P. L.; Mahmood, T. M. T.; McCarthy, H. O.; Woolfson, A. D. Hydrogel-Forming Microneedle Arrays for Enhanced Transdermal Drug Delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22* (23), 4879–4890. <https://doi.org/10.1002/adfm.201200864>.
- (83) Verbaan, F. J.; Bal, S. M.; van den Berg, D. J.; Groenink, W. H. H.; Verpoorten, H.; Lüttge, R.; Bouwstra, J. A. Assembled Microneedle Arrays Enhance the Transport of Compounds Varying over a Large Range of Molecular Weight across Human Dermatomed Skin. *J. Control. Release* **2007**, *117* (2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.11.009>.
- (84) Koutsonanos, D. G.; Martin, M. del P.; Zarnitsyn, V. G.; Sullivan, S. P.; Compans, R. W.; Prausnitz, M. R.; Skountzou, I. Transdermal Influenza Immunization with Vaccine-Coated Microneedle Arrays. *PLoS One* **2009**, *4* (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004773>.
- (85) Sullivan, S. P.; Koutsonanos, D. G.; del Pilar Martin, M.; Lee, J. W.; Zarnitsyn, V.; Choi, S.-O.; Murthy, N.; Compans, R. W.; Skountzou, I.; Prausnitz, M. R. Dissolving Polymer Microneedle Patches for Influenza Vaccination. *Nat. Med.* **2010**, *16* (8), 915–920. <https://doi.org/10.1038/nm.2182>.
- (86) Totti, S.; Ng, K. W.; Dale, L.; Lian, G.; Chen, T.; Velliou, E. G. A Novel Versatile Animal-Free 3D Tool for Rapid Low-Cost Assessment of Immunodiagnostic Microneedles. *Sensors Actuators, B Chem.* **2019**, *296* (March), 126652. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126652>.
- (87) Samant, P. P.; Prausnitz, M. R. Mechanisms of Sampling Interstitial Fluid from Skin Using a Microneedle Patch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (18), 4583–4588. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716772115>.
- (88) NAYAK, S.; SURYAWANSHI, S.; BHASKAR, V. Microneedle Technology for

- Transdermal Drug Delivery: Applications and Combination With Other Enhancing Techniques. *J. Drug Deliv. Ther.* **2016**, *6* (5), 65–83. <https://doi.org/10.22270/jddt.v6i5.1285>.
- (89) Park, Y.; Park, J.; Chu, G. S.; Kim, K. S.; Sung, J. H.; Kim, B. Transdermal Delivery of Cosmetic Ingredients Using Dissolving Polymer Microneedle Arrays. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2015**, *20* (3), 543–549. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0775-0>.
- (90) Sabri, A. H.; Ogilvie, J.; Abdulhamid, K.; Shpadaruk, V.; McKenna, J.; Segal, J.; Scurr, D. J.; Marlow, M. Expanding the Applications of Microneedles in Dermatology. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *140* (January), 121–140. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.001>.
- (91) Donnelly, R. F.; Morrow, D. I. J.; McCarron, P. A.; Woolfson, A. D.; Morrissey, A.; Juzenas, P.; Juzeniene, A.; Iani, V.; McCarthy, H. O.; Moan, J. Microneedle-Mediated Intradermal Delivery of 5-Aminolevulinic Acid: Potential for Enhanced Topical Photodynamic Therapy. *J. Control. Release* **2008**, *129* (3), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.002>.
- (92) Jain, A. K.; Lee, C. H.; Gill, H. S. 5-Aminolevulinic Acid Coated Microneedles for Photodynamic Therapy of Skin Tumors. *J. Control. Release* **2016**, *239*, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.015>.
- (93) Naguib, Y. W.; Kumar, A.; Cui, Z. The Effect of Microneedles on the Skin Permeability and Antitumor Activity of Topical 5-Fluorouracil. *Acta Pharm. Sin. B* **2014**, *4* (1), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.12.013>.
- (94) Ruan, W.; Zhai, Y.; Yu, K.; Wu, C.; Xu, Y. Coated Microneedles Mediated Intradermal Delivery of Octaarginine/BRAF SiRNA Nanocomplexes for Anti-Melanoma Treatment. *Int. J. Pharm.* **2018**, *553* (1–2), 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.043>.
- (95) Pan, J.; Ruan, W.; Qin, M.; Long, Y.; Wan, T.; Yu, K.; Zhai, Y.; Wu, C.; Xu, Y. Intradermal Delivery of STAT3 SiRNA to Treat Melanoma via Dissolving Microneedles. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19463-2>.
- (96) Hassan, M. E.; Bai, J.; Dou, D. Q. Biopolymers; Definition, Classification and Applications. *Egypt. J. Chem.* **2019**, *62* (9), 1725–1737. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2019.6967.1580>.
- (97) Markovsky, E.; Baabur-Cohen, H.; Eldar-Boock, A.; Omer, L.; Tiram, G.; Ferber,

- S.; Ofek, P.; Polyak, D.; Scomparin, A.; Satchi-Fainaro, R. Administration, Distribution, Metabolism and Elimination of Polymer Therapeutics. *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 446–460. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.021>.
- (98) Lee, J. W.; Park, J. H.; Prausnitz, M. R. Dissolving Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Biomaterials* **2008**, *29* (13), 2113–2124. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.048>.
- (99) Marin, E.; Briceño, M. I.; Caballero-George, C. Critical Evaluation of Biodegradable Polymers Used in Nanodrugs. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 3071–3091. <https://doi.org/10.2147/IJN.S47186>.
- (100) Jin, J.; Reese, V.; Coler, R.; Carter, D.; Rolandi, M. Chitin Microneedles for an Easy-to-Use Tuberculosis Skin Test. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3* (3), 349–353. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300185>.
- (101) Chen, M. C.; Ling, M. H.; Lai, K. Y.; Pramudityo, E. Chitosan Microneedle Patches for Sustained Transdermal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (12), 4022–4031. <https://doi.org/10.1021/bm301293d>.
- (102) Tsioris, K.; Raja, W. K.; Pritchard, E. M.; Panilaitis, B.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. Fabrication of Silk Microneedles for Controlled-Release Drug Delivery. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22* (2), 330–335. <https://doi.org/10.1002/adfm.201102012>.
- (103) Chang, H.; Zheng, M.; Yu, X.; Than, A.; Seeni, R. Z.; Kang, R.; Tian, J.; Khanh, D. P.; Liu, L.; Chen, P.; Xu, C. A Swellable Microneedle Patch to Rapidly Extract Skin Interstitial Fluid for Timely Metabolic Analysis. *Adv. Mater.* **2017**, *29* (37), 1–8. <https://doi.org/10.1002/adma.201702243>.
- (104) Yin, Z.; Kuang, D.; Wang, S.; Zheng, Z.; Yadavalli, V. K.; Lu, S. Swellable Silk Fibroin Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *106*, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.178>.
- (105) Cha, K. J.; Kim, T.; Park, S. J.; Kim, D. S. Simple and Cost-Effective Fabrication of Solid Biodegradable Polymer Microneedle Arrays with Adjustable Aspect Ratio for Transdermal Drug Delivery Using Acupuncture Microneedles. *J. Micromechanics Microengineering* **2014**, *24* (11). <https://doi.org/10.1088/0960-1317/24/11/115015>.
- (106) Fukushima, K.; Ise, A.; Morita, H.; Hasegawa, R.; Ito, Y.; Sugioka, N.; Takada, K. Two-Layered Dissolving Microneedles for Percutaneous Delivery of Peptide/Protein Drugs in Rats. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (1), 7–21.

- <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0097-7>.
- (107) Singh, R. S.; Saini, G. K.; Kennedy, J. F. Pullulan: Microbial Sources, Production and Applications. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73* (4), 515–531. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.01.003>.
- (108) Singh, R. S.; Kaur, N.; Rana, V.; Kennedy, J. F. Pullulan: A Novel Molecule for Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *171*, 102–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.089>.
- (109) Fundueanu, G.; Constantin, M.; Oanea, I.; Harabagiu, V.; Ascenzi, P.; Simionescu, B. C. Entrapment and Release of Drugs by a Strict “on-off” Mechanism in Pullulan Microspheres with Pendant Thermosensitive Groups. *Biomaterials* **2010**, *31* (36), 9544–9553. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.062>.
- (110) Scomparin, A.; Salmaso, S.; Bersani, S.; Satchi-Fainaro, R.; Caliceti, P. Novel Folated and Non-Folated Pullulan Bioconjugates for Anticancer Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *42* (5), 547–558. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.02.012>.
- (111) Tao, X.; Tao, T.; Wen, Y.; Yi, J.; He, L.; Huang, Z.; Nie, Y.; Yao, X.; Wang, Y.; He, C.; Yang, X. Novel Delivery of Mitoxantrone with Hydrophobically Modified Pullulan Nanoparticles to Inhibit Bladder Cancer Cell and the Effect of Nano-Drug Size on Inhibition Efficiency. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2769-x>.
- (112) Faraday, M. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Phil. Trans. R. Soc.* **1857**, *147* (0), 145–181. <https://doi.org/10.1098/rstl.1857.0011>.
- (113) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11* (c), 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.
- (114) Yeh, Y. C.; Creran, B.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. *Nanoscale* **2012**, *4* (6), 1871–1880. <https://doi.org/10.1039/c1nr11188d>.
- (115) Manivasagan, P.; Bharathiraja, S.; Bui, N. Q.; Jang, B.; Oh, Y. O.; Lim, I. G.; Oh, J. Doxorubicin-Loaded Fucoidan Capped Gold Nanoparticles for Drug Delivery and Photoacoustic Imaging. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *91*, 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.007>.
- (116) Pinto, R. J. B.; Bispo, D.; Vilela, C.; Botas, A. M. P.; Ferreira, R. A. S.; Menezes, A. C.; Campos, F.; Oliveira, H.; Abreu, M. H.; Santos, S. A. O.; Freire, C. S. R.

- One-Minute Synthesis of Size-Controlled Fucoidan-Gold Nanosystems: Antitumoral Activity and Dark Field Imaging. *Mater. (Basel, Switzerland)* **2020**, *13* (5). <https://doi.org/10.3390/ma13051076>.
- (117) Davis, S. P.; Landis, B. J.; Adams, Z. H.; Allen, M. G.; Prausnitz, M. R. Insertion of Microneedles into Skin: Measurement and Prediction of Insertion Force and Needle Fracture Force. *J. Biomech.* **2004**, *37* (8), 1155–1163. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2003.12.010>.
- (118) Jang, H.; Kang, K.; El-Sayed, M. A. Facile Size-Controlled Synthesis of Fucoidan-Coated Gold Nanoparticles and Cooperative Anticancer Effect with Doxorubicin. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (30), 6147–6153. <https://doi.org/10.1039/c7tb01123g>.
- (119) Larrañeta, E.; Moore, J.; Vicente-Pérez, E. M.; González-Vázquez, P.; Lutton, R.; Woolfson, A. D.; Donnelly, R. F. A Proposed Model Membrane and Test Method for Microneedle Insertion Studies. *Int. J. Pharm.* **2014**, *472* (1–2), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.042>.