



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO NA PELE DE
FÁRMACO UTILIZADO NA QUIMIOTERAPIA DE MELANOMA

Estudante: Thaís Yumi Uwai

Matrícula: 17/0156796

Orientador: Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-orientadora: MsC. Camila Oliveira Cardoso

Brasília - DF

2023

THAÍS YUMI UWAI

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO NA PELE DE
FÁRMACO UTILIZADO NA QUIMIOTERAPIA DE MELANOMA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Departamento de Farmácia da Faculdade de
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília
como requisito parcial à obtenção do grau de
Farmacêutica

Orientador: Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Co-orientadora: MsC. Camila Ol. Cardoso

Brasília - DF

2023

Dedico aos meus pais, Eduardo e Elizabet; ao meu irmão, Akira e, em memória dos meus avós, Toshie, Kiyoshi, Shimako e Kazuo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaís Yumi Uwai

Validação de método analítico para quantificação na pele de fármaco utilizado na quimioterapia de melanoma

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção de grau Farmacêutico.

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Presidente)

Universidade de Brasília

Prof^ª. Dr^ª. Náira Silva Campos (Avaliadora)

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, em especial, meus pais, Eduardo e Elizabet; meu irmão, Akira; meus primos, Camila e Felipe, por todo apoio, conselhos e incentivo; e aos meus falecidos avós, Toshie, Kiyoshi, Shimako e Kazuo, por tudo que me ensinaram.

Ao meu grande companheiro de vida, Frederico, por toda a história que construímos juntos, que se inicia desde os tempos de cursinho e se estende até os dias de hoje, estando sempre presente nos momentos importantes da minha vida.

À minha melhor amiga, Beatriz, por todos os conselhos, me apoiando nos momentos felizes e tristes. Além de ser um grande exemplo para mim de esforço e dedicação.

Aos meus amigos que considero como uma família, Victor, Clara e Luiza, por todas as risadas e loucuras.

Aos meus amigos de graduação, em especial Nara, Fernanda, Laura, Isadora, Laís, Nana, Nathália, Calebe e Lenart, pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos de cursinho, Filipe, Raquel, Luiz, Ana Luiza e Viviane, pelo exemplo do que é disciplina, dedicação, resiliência e perseverança.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Gelfuso, pela paciência, apoio e disposição que se inicia desde a orientação na Iniciação Científica, até o Trabalho de Conclusão de Curso.

À minha co-orientadora, Camila Cardoso, pelos ensinamentos, correções e auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

À professora Naira, por sempre se mostrar disposta a sanar dúvidas e esclarecer melhor o conteúdo. Além da contribuição como membro da banca do meu projeto.

Aos meus colegas de laboratório, pela ajuda em alguns experimentos, principalmente, ao Lucas, Breno e Luma.

Aos meus demais professores de graduação, que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, principalmente ao Enrique, pelas aulas de autoconhecimento que tanto me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

RESUMO

A dacarbazina (DTIC) é o principal agente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento quimioterápico de melanoma metastático. A DTIC se encontra atualmente na forma de pó para solução injetável, tendo efeito sistêmico, causando uma série de sintomas indesejáveis ao paciente, entre eles, náuseas, vômitos e hepatotoxicidade. Dessa maneira, uma via tópica de administração do fármaco poderia proporcionar um tratamento local, mais específico e com diminuição dos efeitos adversos, aumentando a adesão do paciente ao tratamento e melhora na qualidade de vida do mesmo. Assim, o objetivo deste trabalho é validar um método analítico para quantificação da DTIC que possibilite estudos de permeação cutânea. Neste estudo, os parâmetros de validação realizados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Para o estudo, usou-se uma coluna C₁₈ de fase reversa como fase estacionária e uma fase móvel contendo metanol e tampão fosfato de sódio mono-hidratado pH 6,5 (0,01 mol/L), com vazão de 1,0 mL/min. O método proposto se apresentou seletivo uma vez que o pico cromatográfico da dacarbazina foi muito característico, preciso com um coeficiente de variação inferior a 3,8%, linear, com coeficiente de correlação de 0,9995 para um intervalo de concentrações variando de 1,0 µg/mL até 15,0 µg/mL, exato, considerando taxas de recuperação dentro do intervalo aceito de 85-115%, e sensível, uma vez que apresentou limite de detecção e limite de quantificação baixos (0,1 µg/mL e 0,3 µg/mL, respectivamente). O método analítico proposto foi capaz de quantificar a dacarbazina em estudos de permeação cutânea *in vitro*. Dessa maneira, conclui-se que é possível se realizar mais estudos que envolvem formulações tópicas contendo a DTIC.

Palavras-chave: Dacarbazina. Cromatografia líquida de alta eficiência. Método analítico. Melanoma.

ABSTRACT

Dacarbazine (DTIC) is the main agent approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the chemotherapy treatment of metastatic melanoma. DTIC is currently in the form of a powder for solution for injection and has a systemic effect, causing a series of undesirable symptoms for the patient, including nausea, vomiting and hepatotoxicity. In this way, a topical route of drug administration could provide a more specific local treatment with fewer adverse effects, increasing patient adherence to treatment and improving their quality of life. The aim of this study was therefore to validate an analytical method for the quantification of DTIC to enable skin permeation studies. In this study, the validation parameters used were selectivity, linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantification. For the study, a reverse phase C18 column was used as the stationary phase and a mobile phase containing methanol and sodium phosphate buffer monohydrate pH 6.5 (0.01 mol/L), with a flow rate of 1.0 mL/min. The proposed method was selective since the chromatographic peak of dacarbazine was very characteristic, precise with a coefficient of variation of less than 3.8%, linear, with a correlation coefficient of 0.9995 for a concentration range varying from 1, 0 $\mu\text{g/mL}$ up to 15.0 $\mu\text{g/mL}$, accurate, considering recovery rates within the accepted range of 85-115%, and sensitive, since it presented low limit of detection and limit of quantification (0.10 $\mu\text{g/mL}$ and 0.30 $\mu\text{g/mL}$, respectively). The proposed analytical method was able to quantify dacarbazine in in vitro skin permeation studies. It is therefore concluded that further studies involving topical formulations containing DTIC can be carried out.

Keywords: Dacarbazine. High performance liquid chromatography. Analytical method. Melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regras de identificação de melanoma.....	3
Figura 2. Pele danificada pela ação de radiação solar com presença de melanoma em estágio inicial.....	4
Figura 3. Tumor em estágio avançado.....	4
Figura 4. Esquema de melanoma estágio 0	7
Figura 5. Esquema de melanoma estágio IA e IB	8
Figura 6. Esquema de melanoma estágio IIA, IIB, IIC	8
Figura 7. Esquema de melanoma estágio III	9
Figura 8. Esquema de melanoma estágio IV	10
Figura 9. Dacarbazina em pó para solução injetável	12
Figura 10. Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	14
Figura 11. Estrutura C18 ligada ao Dióxido de Silício	15
Figura 12. Esquema do funcionamento de Detector UV-Vis	16
Figura 13. Peles de orelha de porco fixadas em suporte para separação das três camadas	18
Figura 14. EC, FP, PR em triplicata sob agitação magnética em metanol para posterior avaliação em CLAE	18
Figura 15. Preparo de solução tampão fosfato de sódio monobásico, 0,01 M, pH 6.5	19
Figura 16. Célula de difusão do tipo Franz	22
Figura 17. Permeação em célula tipo Franz.....	23
Figura 18. Camadas da pele sob agitação magnética.....	24
Figura 19. Filtração da solução extraída após agitação magnética em metanol	24
Figura 20. Sobreposição dos cromatogramas dos interferentes – impurezas A e B, PBS e extratos da pele (EC, FP e PL) – em relação ao fármaco em metanol. DTIC – Dacarbazina; EC – extrato córneo; FP – folículo piloso; PR – pele remanescente; PBS – tampão fosfato... ..	25

Figura 21. Ensaio de seletividade referente à Dacarbazina, às impurezas A e B, ao PBS e aos extratos da pele (EC, FP e PL). (A) Análise de seletividade da área do pico do fármaco em relação aos interferentes (B) Análise de seletividade do tempo de retenção do fármaco em relação aos interferentes. Análise estatística por ANOVA: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. DTIC – Dacarbazina; EC – estrato córneo; FP – folículo piloso; PR – pele remanescente; PBS – tampão fosfato26

Figura 22. Representação gráfica da curva analítica, na faixa de concentração de 1 a 15 $\mu\text{g/mL}$. Equação da reta: $y = 36564x - 10887$ 27

Figura 23. Dacarbazina recuperada da pele (EC, FP e PP) após aplicação do fármaco em solução e em gel em ensaio de penetração cutânea. Análise estatística por ANOVA: ** $p \leq 0,01$. DTIC – Dacarbazina; EC – estrato córneo; FP – folículo piloso; PR – pele remanescente30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agrupamento por estágio de acordo com as características definidas pelo TMN	7
Tabela 2. Dados referentes à avaliação da precisão, relacionando a concentração mensurada do fármaco em termos de coeficiente de variação... ..	28
Tabela 3. Dados referentes à avaliação da repetibilidade, relacionando a concentração mensurada do fármaco em termos de coeficiente de variação... ..	28
Tabela 4. Dados referentes à avaliação da exatidão, relacionando a concentração mensurada do fármaco e sua recuperação nas camadas da pele	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise Variância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de Variação
DHL	Desidrogenase láctica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTIC	Dacarbazina
EC	Etrato Córneo
FP	Folículo Piloso
ICH	Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
PBS	Product Breakdown Structure
pH	Potencial Hidrogeniônico
PR	Pele Remanescente
Q2B	Guia de Validação de Processos Analíticos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	2
2.1 OBJETIVO GERAL	2
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	2
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
3.1 MELANOMA	3
3.2 TIPOS DE MELANOMA.....	5
3.2.1 MELANOMA EXTENSIVO SUPERFICIAL	5
3.2.2 MELANOMA ACRAL LENTIGINOSO.....	5
3.2.3 LENTIGO MALIGNO	5
3.2.4 MELANOMA NODULAR	6
3.3 ESTÁGIOS DO MELANOMA	6
3.3.1 ESTÁGIO 0	7
3.3.2 ESTÁGIO I e II.....	8
3.3.3 ESTÁGIO III	9
3.3.4 ESTÁGIO IV	9
3.4 DIAGNÓSTICO DE MELANOMA	10
3.5 TRATAMENTO PARA MELANOMA.....	11
3.5.1 CIRURGIA	11
3.5.2 RADIOTERAPIA	11
3.5.3 IMUNOTERAPIA	11
3.5.4 TERAPIA DIRECIONADA.....	12
3.5.5 QUIMIOTERAPIA.....	12
3.6 TRATAMENTO TÓPICO PARA MELANOMA.....	12
3.7 PERMEAÇÃO CUTÂNEA PARA FORMULAÇÃO EM GEL X SOLUÇÃO.....	13
3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 MATERIAL	17
4.2 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA DACARBAZINA	17
4.3 SEPARAÇÃO DAS CAMADAS DA PELE	17
4.4 VALIDAÇÃO.....	17
4.4.1 SELETIVIDADE.....	19

4.4.2 LINEARIDADE	20
4.4.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	20
4.4.4 PRECISÃO	21
4.4.5 EXATIDÃO	21
4.4.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA ATRAVÉS DE ESTUDOS DE PERMEAÇÃO.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 SELETIVIDADE.....	25
5.2 LINEARIDADE	27
5.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	27
5.4 PRECISÃO	28
5.5 EXATIDÃO.....	29
5.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA ATRAVÉS DE ESTUDOS DE PERMEAÇÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

O melanoma, embora represente apenas 4% de todos os cânceres dermatológicos, é responsável por 80% das mortes por câncer de pele. É, portanto, considerado o tipo de câncer de pele mais agressivo, por possuir alta possibilidade de se espalhar para tecidos e órgãos vizinhos, causando, no mundo, cerca de 55.500 mortes e no Brasil, cerca de 2.000 mortes anualmente [1–5].

Atualmente, para o tratamento de melanoma metastático, o principal agente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) é a dacarbazina [3]. Este é um agente citostático que possui efeito antineoplásico, inibindo o crescimento celular independente do ciclo da célula, e matando as células cancerosas por adição de um grupamento alquila no DNA celular [5,6]. O fármaco é encontrado na forma farmacêutica de pó para solução injetável ou para perfusão. Sendo assim, seu efeito é sistêmico, causando uma série de efeitos indesejáveis no organismo, tais como anorexia, náuseas, vômitos, anemia, mielotoxicidade e hepatotoxicidade [8,9,10].

Dessa maneira, o desenvolvimento de uma formulação tópica contendo a dacarbazina poderia contornar os efeitos adversos de uma formulação sistêmica. Assim, a aplicação tópica permitiria um tratamento local, mais específico, conseqüentemente menos invasivo, e comprometendo menos o organismo [7]. A literatura ainda não apresenta estudos de quantificação da dacarbazina recuperada da pele, apenas em plasma ou urina [11,12]. Assim, um método analítico para quantificação de dacarbazina recuperada da pele é essencial para auxiliar no desenvolvimento de formulações tópicas contendo este fármaco.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação da dacarbazina nas camadas da pele, possibilitando seu uso em ensaios de permeação cutânea. O ensaio de permeação foi realizado para avaliar se o método desenvolvido está adequado de acordo com as diretrizes oficiais da RDC 166 da ANVISA, ICH (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano) e FDA (*Food and Drug Administration*).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação da dacarbazina nas camadas da pele, possibilitando seu uso em ensaios de permeação cutânea.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- Verificar se o método desenvolvido está adequado de acordo com as diretrizes oficiais, avaliando-se parâmetros de seletividade, precisão, exatidão e limites de detecção e de quantificação.
- Avaliar a permeação *in vitro* da dacarbazina a partir da sua solução e sua formulação em gel utilizando o método validado.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MELANOMA

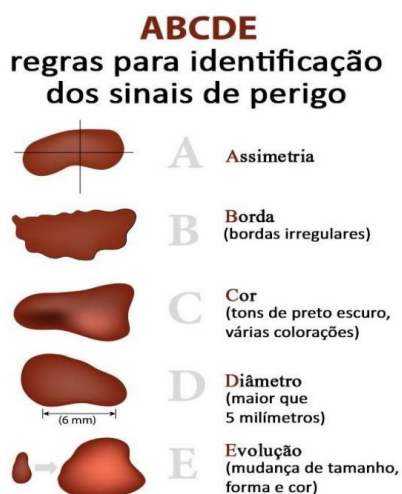
O melanoma é uma neoplasia maligna proveniente dos melanócitos da pele. Os melanócitos são células responsáveis pela produção de melanina, um pigmento presente na pele, olhos, trato gastrointestinal e nas membranas mucosas oral, genital e nasossinusal.

O melanoma tem origem na exposição à radiação ultravioleta, podendo esta ser proveniente da luz solar natural ou do bronzamento artificial. Em geral, é responsável por 90% dos diagnósticos de melanoma em populações brancas [1-5].

Para a identificação de melanoma usa-se a regra do ABCDE (Figura 1), em que A significa assimetria; B, borda; C, cor; D diâmetro; E, evolução. Sendo que a mancha pode surgir a partir de uma pinta preexistente ou sem presença de lesão prévia, podendo ocorrer em qualquer parte do corpo [13,14].

Figura 1. Regras de identificação de melanoma.

Fonte: Novartis, 2017



Os melanomas primários (Figura 2) são escuros e são tratados com excisão ampla por meio de cirurgia, que se estende por toda espessura do tumor. As terapias medicamentosas sistêmicas são recomendadas a serem realizadas juntamente à cirurgia em pacientes com metástases e são a base do tratamento do melanoma em etapas mais avançadas (Figura 3). Tema que será mais profundamente abordado no decorrer do trabalho.

A prevenção primária contra melanoma é o uso regular de filtro solar, além de seus complementos, como chapéu, óculos e roupas protetoras, evitar sol durante os horários de pico de raios UV [13, 15].

Figura 2. Pele danificada pela ação de radiação solar com presença de melanoma primário.

Fonte: Rebecca, 2018

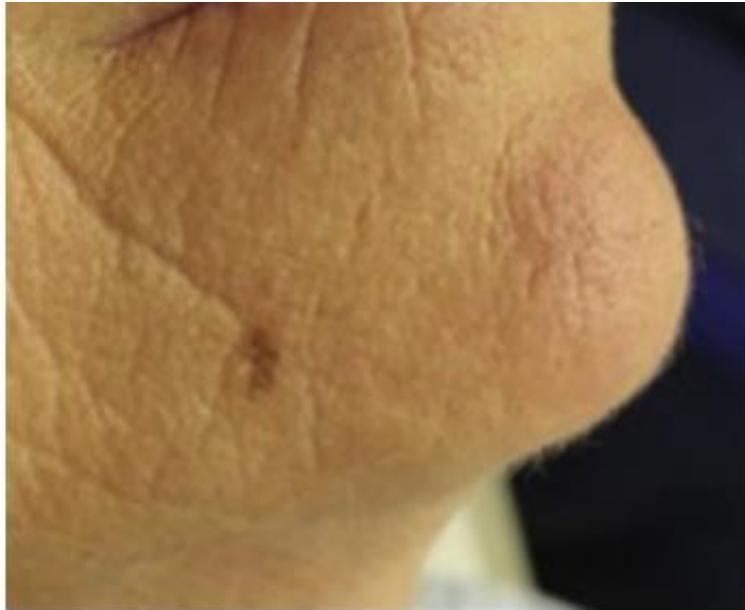


Figura 3. Tumor em estágio avançado.

Fonte: Rebecca, 2018



3.2 TIPOS DE MELANOMA

Há quatro tipos principais de melanoma: extensivo superficial, acral-lentiginoso, maligno e nodular.

3.2.1 MELANOMA EXTENSIVO SUPERFICIAL

O melanoma extensivo superficial é o mais comum dos melanomas, sendo observado em cerca de 70% dos casos, principalmente em indivíduos jovens. É mais comum em pessoas com pintas pré-existentes ou com histórico de melanoma na família [13,16]. Seu crescimento ocorre de forma horizontal na camada superior da pele, pode demorar anos até começar a penetrar verticalmente nas camadas e atingir de maneira mais profunda a pele [13,16].

O melanoma extensivo superficial é observado em pacientes com exposição solar e à queimadura solar. A radiação ultravioleta proveniente dos raios solares, realiza alterações nas células da pele, que podem provocar o aparecimento de neoplasias malignas. Em indivíduos de pele mais clara, o risco de desenvolvimento deste tipo de câncer é maior [13,16].

3.2.2 MELANOMA ACRAL LENTIGINOSO

O melanoma acral lentiginoso é predominante em asiáticos e negros. Sendo de difícil diagnóstico, e, conseqüentemente, o tratamento ocorre em fases mais avançadas da doença, uma vez que se manifesta como manchas variando de marrom a preta nas regiões das mãos e dos pés. Assim como o melanoma extensivo superficial, se inicia horizontalmente para depois crescer verticalmente. Pode progredir mais rapidamente do que o melanoma extensivo superficial e do que o lentigo maligno [13,16].

Uma forma de se evitar ou realizar o diagnóstico precoce é analisar toda a superfície corporal observando se há presença de mancha irregular marrom, preta ou azulada, incluindo as regiões palmares, plantares e as unhas [13,16].

3.2.3 MELANOMA MALIGNO

O lentigo maligno é o menos comum de todos os melanomas, acomete geralmente a população idosa, que com o passar dos anos tiveram exposição solar contínua. Se inicia como um melanoma extensivo superficial e progride para as camadas mais profundas da pele [13,16].

3.2.4 MELANOMA NODULAR

O melanoma nodular acomete cerca de 10 a 15% dos casos de melanoma. Pode ocorrer em qualquer faixa etária e ocorre predominantemente em população do sexo masculino. Podendo manifestar-se em qualquer região do corpo humano, incluindo as áreas não expostas ao Sol. Devido ao crescimento acelerado, é considerado o de pior prognóstico ao paciente, uma vez que se mostra invasivo desde o momento do diagnóstico, com acometimento das camadas superficiais e profundas da pele. Surge como um nódulo ou pequeno tumor que cresce rapidamente, podendo ser de coloração negra, azul, cinza, marrom ou vermelha [13,16].

3.3 ESTÁGIOS DO MELANOMA

O melanoma pode se encontrar nos estágios 0, I, II, III ou IV. Quanto maior o estágio, maior a gravidade.

É de extrema importância diagnosticar em qual estágio está o melanoma para que se proponha o método mais adequado para o tratamento ou mitigação dos sintomas de acordo com o grau de disseminação do câncer do paciente.

A classificação TNM (Tabela 1) define o estadiamento da lesão, sendo T para tumor primário, M metástase e N linfonodo regional [16].

T - Representa a espessura da lesão inicial

Tis - melanoma in situ

T1: ≤ 2 cm

T2: 2cm- 4cm

T3: >4 cm

T4: tumor invade estrutura adjacente

M - Representa a presença de lesões cutâneas ou em outros órgãos.

M0: sem metástases

M1: metástase à distância

N - Representa a invasão ou não dos gânglios linfáticos.

N0: Ausência de metástase em linfonodos regionais

N1: Metástase em um linfonodo, ≤ 3 cm em sua maior dimensão

N2: Metástase em um linfonodo, entre 3 a 6 cm em sua maior dimensão

N3: Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão

Tabela 1. Agrupamento por estágio de acordo com as características definidas pelo TMN [16].

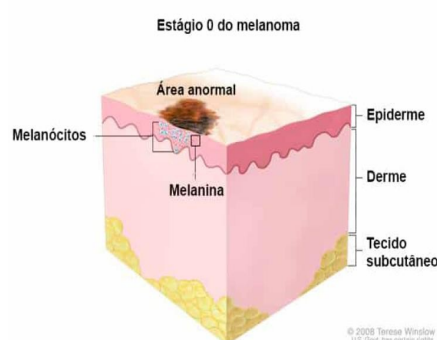
AGRUPAMENTO POR ESTÁGIO			
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio I	T1	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio III	T1, T2, T3	N1	M0
Estágio IV	T1,T2,T3,T4	N0, N1,N2,N3	M1

3.3.1 ESTÁGIO 0

O estágio 0 é o estágio menos agressivo para o paciente, sendo este com alto potencial deregressão da lesão (Figura 4) [13].

Figura 4. Esquema de melanoma estágio 0

Fonte: Terese, 2014



3.3.2 ESTÁGIOS I e II

Subdividido diversas categorias, sendo que quanto maior a o número, maior é a gravidade do melanoma (Figura 5 e 6) [13].

Figura 5. Esquema de melanoma estágio IA e IB

Fonte: Terese, 2014

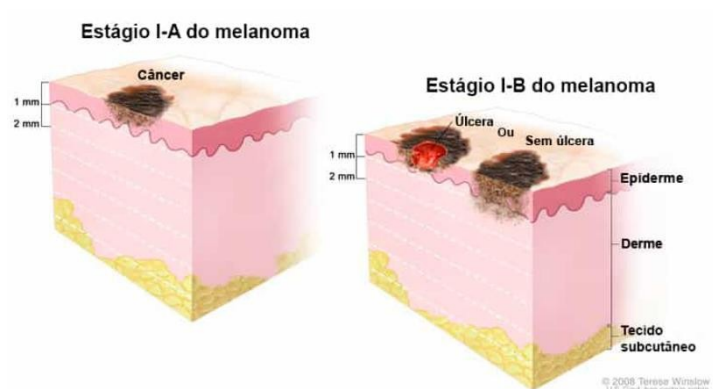


Figura 6. Esquema de melanoma estágio IIA, IIB, IIC

Fonte: Terese, 2014

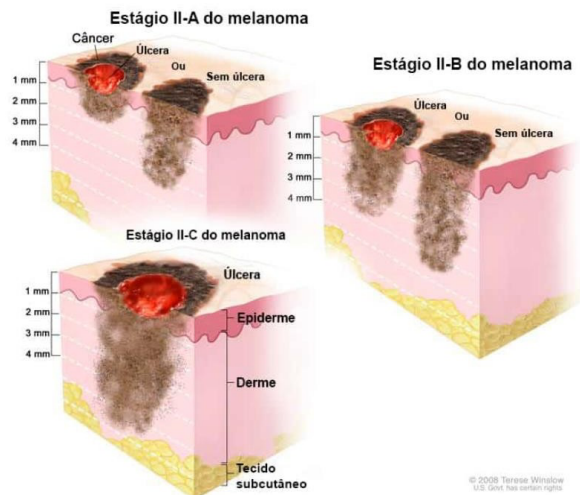
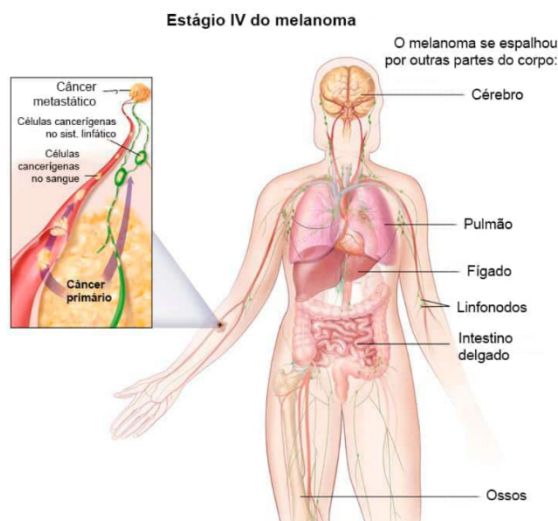


Figura 8. Esquema de melanoma estágio IV

Fonte: Terese, 2014



3.4 DIAGNÓSTICO DE MELANOMA

Existem uma série de métodos e procedimentos para se realizar o diagnóstico de melanoma e analisar qual seu estadiamento. Entre eles:

- Exame físico e histórico: Análise do corpo, à procura de sinais de doença, como nódulos, protuberâncias ou qualquer sinal incomum. Além do rastreamento dos hábitos de saúde do paciente e sua família, incluindo doenças passadas.
- Mapeamento de linfonodos e biópsia de linfonodo sentinela: Análise no microscópio de amostra de tumor corada em azul, de maneira a verificar se espalhou para os gânglios linfáticos e se é necessária a retirada de todos [13,23].
- Tomografia computadorizada: Análise de imagens do interior do organismo por meio de máquina de raio-x usando-se corante para facilitar a visualização dos órgãos e tecidos, como tórax, abdome e pelve [13,24].
- PET scan (tomografia de emissão de pósitrons): Injeção de glicose radioativa na veia, de forma a encontrar células tumorais malignas no organismo. O scanner PET permite melhor visualização das células cancerosas, dado que estas são mais ativas e usam mais glicose do que as células normais. Esse exame é realizado nas suspeitas de metástases ou quando já existem metástases e se quer um controle de resposta ao tratamento por imuno ou quimioterapia do melanoma avançado [13,25].
- Ressonância Nuclear Magnética: Realização de imagens do interior do organismo por meio de um ímã, ondas radioativas e um computador. Injeção de gadolínio na veia e posterior deposição em torno do câncer, fazendo com que as células tumorais se sobressaiam na imagem. A ressonância magnética é utilizada quando existem suspeitas de metástases cerebrais ou para controle de resposta ao tratamento.
- Exames laboratoriais de sangue: Análise clínica de amostra de sangue de maneira a se

avaliar a quantidade que determinados componentes liberados por órgãos e tecidos no corpo como indicativo de doença mais grave, a exemplo do DHL [13].

3.5 TRATAMENTO PARA MELANOMA

Nas últimas décadas, a maneira de se tratar o melanoma foi se transformando, à medida que se realizavam mais estudos em relação ao tema. Essas novas propostas, como a terapia sistêmica, permitiram em 3 anos, uma redução em 18% da taxa de mortalidade em populações brancas, uma vez que se mostraram eficazes para a metástase cerebral assintomática [26].

Dentre as novas propostas, encontramos cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapias direcionadas

3.5.1 CIRURGIA

A cirurgia de melanoma é o ato de realizar a remoção das células cancerígenas naquela região, de maneira a aumentar a probabilidade de cura e mitigar a chance de metastatização. Esse método é mais indicado para melanomas em estágios iniciais com invasão ganglionar, mas ainda sem metástase [26]. Entretanto, este procedimento não é viável em todos os locais, uma vez que regiões como pulmão, cérebro e fígado não são acessíveis para procedimento cirúrgico de melanoma. Além disso, deixa a região mais suscetível a infecções na pele, por se tratar de um procedimento que lesiona a proteção do organismo. Assim, por não ser considerado um procedimento totalmente eficaz, este é combinado com outras alternativas terapêuticas [26].

3.5.2 RADIOTERAPIA

O tratamento paliativo é uma forma de cuidado que tem por objetivo aumentar a qualidade de vida do paciente. Esse tratamento pode ser realizado de diversas maneiras, entre elas, por meio da radioterapia, que faz uso de radiações ionizantes para retardar o crescimento de células cancerosas, sendo implementada após cirurgia na pele, no sistema nervoso central, na coluna e nos ossos [27].

3.5.3 IMUNOTERAPIA

Os anticorpos são células de defesa naturais do sistema imunológico do corpo humano, que protegem o organismo de agentes externos causadores de alguma enfermidade. Usando esse princípio, a imunoterapia faz uso de medicamentos à base de anticorpos, de forma a combater as células cancerígenas [28].

3.5.4 TERAPIA DIRECIONADA

Uso de fármacos que agem em moléculas que atuam especificamente na progressão e disseminação do câncer, como vias de sinalização intracelulares, de maneira a impedir o crescimento e sobrevivência dessas células. O fato de atuarem em moléculas alvo, permite um tratamento mais específico e com menos efeitos indesejados [28].

3.5.5 QUIMIOTERAPIA

Atualmente existem vários fármacos quimioterápicos que podem ser usados para tratar o melanoma, mas para esse projeto, o foco será dado para dacarbazina [27].

A dacarbazina (Figura 9) foi o primeiro agente quimioterápico citotóxico aprovado pela FDA para melanoma metastático, sendo considerado o padrão de tratamento durante muitos anos [1-6].

A quimioterapia com uso de dacarbazina é realizada para tratamento de melanoma por via endovenosa, em que o fármaco entra na corrente sanguínea, é metabolizado pelo fígado, de forma que gera lesões no DNA e consequente quebra de fita dupla [6], diminuindo o crescimento de células cancerosas. Entretanto, a infusão de fármacos citotóxicos no organismo afeta tanto células tumorais quanto saudáveis.

Seu tratamento sistêmico, que dura em torno de 7 a 8 meses [29], traz ao paciente uma série de efeitos indesejáveis, tais como dispneia, náuseas e vômitos, anemia, mielotoxicidade e hepatotoxicidade [8,9,10].

Figura 9. Dacarbazina em pó para solução injetável

Fonte: Da autora



3.6 TRATAMENTO TÓPICO PARA MELANOMA

A via tópica, tem como benefício, quando comparado com outras vias, eliminação do efeito de primeira passagem hepática, aumento da biodisponibilidade do fármaco, manutenção

de níveis sanguíneos constantes do fármaco, liberação do fármaco por tempo prolongado e redução dos efeitos secundários [30-32].

Quando comparada à via intravenosa, que é a atual via de administração da dacarbazina para tratamento de melanoma, tem como principal vantagem, redução de efeitos secundários indesejáveis, ser indolor, não invasivo e ser menos agressivo para o organismo, uma vez que o efeito sistêmico causado pela via intravenosa, possui ação indistinta para células benignas e malignas [30-32]. Dessa forma, o desenvolvimento de novas formulações para aplicação tópica poderia melhorar a adesão ao tratamento e a qualidade de vida do paciente. Para que essa proposta seja viável, é necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de identificar a presença do fármaco em meio aos interferentes da pele.

3.7 PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A permeação de substâncias nas camadas da pele depende da lipofilicidade, tamanho molecular, carga e estrutura da camada. Substâncias de natureza apolar tendem a penetrar na pele de maneira intracelular, se difundindo pela camada lipídica do estrato córneo, devido a sua característica lipofílica. Enquanto, substâncias de natureza polar tendem a penetrar a pele entre as células, possuem maior facilidade de se difundirem para camadas mais profundas, devido às suas características hidrofílicas [33].

Entretanto, a formulação em que está a substância ativa também interfere em sua permeação. Dessa forma, formulações em gel e em solução aquosa apresentarão diferentes performances de permeação do fármaco.

Soluções são preparações líquidas que contêm substâncias dissolvidas em um solvente ou em solventes miscíveis entre si, já os géis são formulações semissólidas que contêm moléculas dispersas em um meio aquoso.

Para as formulações em gel, o fármaco sedimenta na própria formulação, interage com as camadas da pele e atua localmente [33,34]. A presença do agente gelificante na formulação de gel confere ao meio uma maior viscosidade [33], que pode influenciar no processo de permeação do medicamento nas camadas da pele, comprometendo a interação do fármaco com a pele [34], uma vez que a velocidade de sedimentação das partículas de uma suspensão é representada pela lei de Stokes:

$$V = \frac{r^2(\rho_s - \rho_m)g}{18\mu}$$

(Equação I),

onde: V é a velocidade de sedimentação, r^2 é o diâmetro das partículas, ρ_s a densidade o sólido, ρ_m é a densidade do meio, g é a constante gravitacional e μ é a viscosidade do meio. Ou seja,

a velocidade de sedimentação é maior em partículas grandes.

3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para a validação do método analítico proposto no estudo, usou-se um Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (Figura 10) de maneira a se obter resultados confiáveis e que cumpram com os critérios exigidos pelos compêndios oficiais, sendo todas as etapas devidamente documentadas [35].

Figura 10. Cromatógrafo

Fonte: Cromatografia Líquida (HPLC/LCMS), 2023



O Cromatógrafo é um equipamento com a função de se realizar a separação de componentes presentes em uma mistura de substâncias por meio de uma técnica chamada Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Esta, é uma técnica físico-química de separação de substâncias por meio das diferentes interações intermoleculares provenientes de uma diferença de polaridade entre as moléculas. Em que, moléculas apolares sofrem maior interação com a fase estacionária apolar na coluna de fase reversa, de modo que fique retido por mais tempo na coluna.

O Cromatógrafo é subdividido em diversos ~~módulos~~ entre eles:

- Reservatório da fase móvel
- Sistema de bombeamento
- Injeção da amostra
- Coluna cromatográfica
- Detector UV-Vis
- Descarte

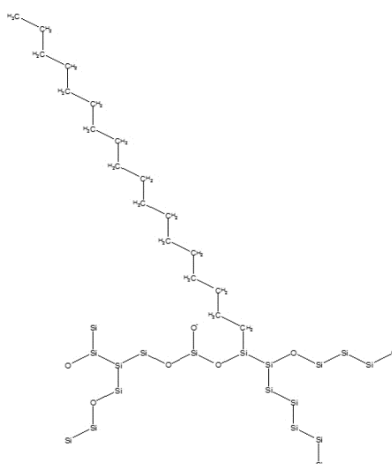
O reservatório da fase móvel é local em que se armazena os frascos dos componentes que irão percorrer a coluna cromatográfica. Para esse estudo, foi utilizado metanol e tampão fosfato de sódio monobásico 0,01M pH 6,5. A fase móvel é aspirada do reservatório por meio de um sistema de bombeamento de forma que flua por todo percurso analítico. Este, possui uma válvula que alterna entre os canais de aspiração da fase móvel, permitindo a mistura de solvente de acordo com o desejo do analista, de maneira a controlar a polaridade [35]. Por meio de um sistema de injeção da amostra, esta é aspirada, e, junto à fase móvel, é direcionada para a coluna cromatográfica.

Para esse experimento usou-se uma coluna C18. A nomenclatura C18 se refere ao número de átomos de carbono na cadeia (Figura 11). Esta, está diretamente relacionada às propriedades físicas do Hidrocarboneto. Assim, C1 a C4 são gasosos; C5 a C17 são líquidos; C18 e maiores são sólidos [36]. Para a preparação de uma coluna C18, usa-se uma cadeia de 18 carbonos, fixa-se este grupo alcano à Sílica. A Sílica é inerte e com alto grau de pureza, de maneira a proporcionar bom desempenho na corrida analítica e alta eficiência em partículas de 3 μ m, 5 μ m e 10 μ m. Ideal para análise de compostos polares, moderadamente polares e apolares, ácidos e bases ionizados e compostos que diferem em hidrofobicidade. Na coluna de fase reversa, temos uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar, sendo, portanto, inversa à fase normal. A escolha de uma coluna de fase reversa é para facilitar na separação de analitos hidrofóbicos, uma vez que as substâncias apolares ficam retidas por mais tempo.

A coluna C18 de sílica é apolar e caracteriza a fase estacionária. Sendo, portanto, uma fase reversa [36].

Figura 11. Estrutura C18 ligada ao Dióxido de Silício

Fonte: Allcrom, 2023



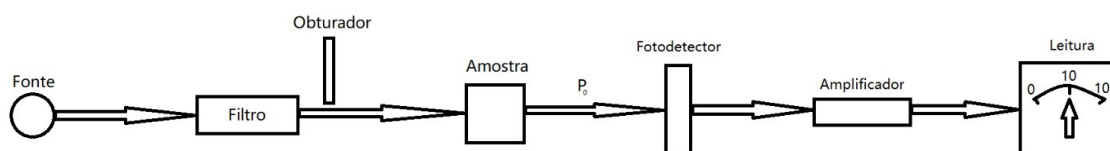
Os solutos na Fase Móvel viajam por meio dos poros de Sílica, sendo atraídos pelo hidrocarboneto por meio de interação hidrofóbica fraca [36].

Após a passagem da amostra pela coluna C18 de fase reversa, são realizadas medidas de

absorção eletromagnéticas, utilizando-se a espectrofotometria UV-Vis. A espectrofotometria UV-Vis é uma técnica analítica utilizada em laboratórios para se determinar qualitativamente e quantitativamente diferentes compostos presentes em uma amostra. Na Figura 12, pode-se observar uma fonte de luz, que é incidida e passa por um filtro que irá selecionar apenas um comprimento de onda específico. O obturador administra o tempo em que este feixe de luz irá passar pela amostra, de acordo com o analista. Essa luz incide sobre a amostra, passa por um detector que amplia essa onda, e faz a respectiva leitura [35-37].

Figura 12. Esquema do funcionamento de Detector UV-Vis

Fonte: Da autora



Após a leitura no espectrofotômetro UV-Vis, o material formado pela fase móvel e amostra é armazenado em frascos para posterior descarte adequado.

O último módulo do Cromatógrafo é o controlador, parte que conecta o aparelho ao computador, em que o analista irá controlar o fluxo de injeção da fase móvel para a coluna cromatográfica [35].

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O padrão analítico da dacarbazina e os produtos de degradação A (2-azahypoxanthine, impureza A) e B (5-amino-4-imidazolecarboxamide, impureza B) foram obtidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A acetonitrila e o metanol usados na CLAE foram comprados a J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Todas as preparações e análises foram realizadas com água ultrapura (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França). O Fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio mono-hidratado foram fornecidos pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) para o preparo do tampão, e o ajuste de pH foram realizados com ácido clorídrico e hidróxido de sódio (Contemporary Chemical Dynamics, São Paulo, Brasil). As orelhas de porco vieram indistintamente dos porcos machos e fêmeas criadas para consumo humano (híbridos da raça Landrace e Brancas Grandes). As orelhas foram obtidas imediatamente após os animais serem abatidos (Via Carnes, Formosa, GO, Brasil) e foram mantidos em 4 °C durante o transporte para o laboratório.

4.2 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA DACARBAZINA

A quantificação de dacarbazina foi realizada pelo método cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em que a equipe, ao final do estudo, publicou um artigo com os resultados obtidos. Para analisar a dacarbazina, uma coluna de fase reversa C18 (150 mm x 4,6 mm, 5µm, Discovery, Sigma-Aldrich) foi utilizada como fase estacionária, enquanto a fase móvel foi composta de um gradiente usando solvente A (tampão fosfato de sódio monobásico, 0,01 M, pH 6.5) e solvente B (metanol). O forno foi mantido a 30 °C, a detecção do UV foi de 364 nm, e o volume de injeção das amostras era de 20 µL.

4.3 SEPARAÇÃO DAS CAMADAS DA PELE

As camadas da pele foram separadas por meio de uma técnica chamada *tape stripping*. Para o estudo de avaliação dos parâmetros de validação, a separação das camadas da pele foi realizada antes da incorporação da dacarbazina ao material, enquanto no estudo de permeação, a dacarbazina aplicada sobre a pele íntegra contida em uma formulação, para em seguida se realizar a técnica de separação e posterior avaliação.

Este método de separação é realizado com o uso de fitas adesivas. Nesta técnica, para obtenção dos extratos do estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR), a pele foi colocada num suporte (Figura 13), e o EC foi removido com 15 pedaços de fita adesiva. Ainda presa no suporte, foi gotejada uma cola à base de cianoacrilato, seguida da aplicação da fita adesiva para extração do FP, esse procedimento foi repetido 2 vezes. A pele restante foi

cortada em pequenos pedaços com a ajuda de uma tesoura, obtendo-se a PR. Após a separação das camadas da pele, cada camada foi colocada em um frasco âmbar. Para extração do fármaco foram adicionados 5 mL de metanol e deixados em ultrassom por 5 min e, em seguida, agitação magnética por 24 h (Figura 14).

Figura 13. Peles de orelha de porco fixadas em suporte para separação das três camadas

Fonte: Da autora



Figura 14. EC, FP, PR em triplicata sob agitação magnética em metanol para posterior avaliação em CLAE

Fonte: Da autora



4.4 VALIDAÇÃO

O método analítico foi desenvolvido e validado por meio de um CLAE, analisando-se parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação. Foram considerados as diretrizes RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [38] e International Conference on Harmonisation Q2B [39].

4.4.1 SELETIVIDADE

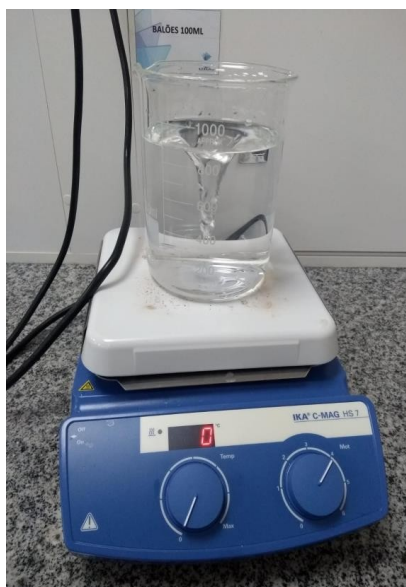
A seletividade é a capacidade de identificar a dacarbazina, inequivocamente, mesmo na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra do experimento, como impurezas, tampão, diluentes e interferentes provenientes da matriz [38,40,41]. Essa análise busca quantificar a dacarbazina nas 3 camadas da pele após a sua aplicação tópica. Esse experimento foi feito analisando os picos cromatográficos formados pelo fármaco, pelo tampão, pelas 3 camadas da pele, e pelas impurezas A (2-azahypoxanthine) e B (5-amino-4-imidazolecarboxamide).

É importante se analisar cada um desses componentes de maneira individual, pois estes simulam *in vitro*, como seria o comportamento deles *in vivo*, uma vez que são encontrados diversos interferentes durante a permeação do fármaco na pele.

O tampão (Figura 15) utilizado simula o sangue no organismo, uma vez que o sangue também é uma solução tampão. Ou seja, apresenta pequenas variações de pH, mesmo com altas alterações nas concentrações dos componentes. Já as impurezas, (2-azahypoxanthine, impureza A e 5-amino-4-imidazolecarboxamide, impureza B) são produtos de degradação da dacarbazina [42,43].

Figura 15. Preparo de solução tampão fosfato de sódio monobásico, 0,01 M, pH 6.5

Fonte: Da autora



A análise foi realizada comparando os picos cromatográficos do fármaco com as matrizes (EC, FP, PR, tampão, impureza A e impureza B). Além disso, foi comparado o tempo de retenção e a área do fármaco em solução em relação aos contaminantes. O processo foi realizado em sextuplicata com a significância definida em $p \leq 0,05$.

4.4.2 LINEARIDADE

A linearidade é a capacidade do método de obter uma resposta diretamente proporcional a concentração de dacarbazina adicionada na amostra dentro de um intervalo de concentração estabelecido [38,40]. Esse experimento foi feito através de três curvas analíticas. Primeiramente, foi preparada uma solução estoque com uma concentração de 100 µg/mL de dacarbazina. Em seguida, essa solução foi diluída para se obter concentrações de 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12 e 15 µg/mL do fármaco e assim construir a curva analítica.

Após a análise cromatográfica, os dados foram analisados estatisticamente por regressão linear, significância do coeficiente angular e testes de proporcionalidade usando o teste t de Student ($p = 0,05$). Os fatores de resposta foram calculados considerando a razão entre a área do pico e a concentração do analito.

4.4.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) é definido como sendo a menor concentração de dacarbazina que poder ser detectada pelo equipamento, mas não necessariamente quantificada com exatidão [40,41]. Esse teste foi feito através da seguinte fórmula para dacarbazina:

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S}$$

(Equação II),

onde: σ é o desvio padrão dos valores de intercepção no eixo Y da curva de calibração e S é o coeficiente angular da curva de calibração.

Já o limite de quantificação (LQ) é definido como sendo a menor concentração de dacarbazina que pode ser determinada com precisão e exatidão adequados em condições estabelecidas pelo experimento [41]. O LQ foi determinado através da seguinte fórmula:

$$LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

(Equação III),

onde: σ é o desvio padrão dos valores de intercepção no eixo Y da curva de calibração e S é o coeficiente angular da curva de calibração.

Foram utilizados os resultados obtidos com a curva de calibração em que o σ é o desvio

padrão do intercepto com o eixo Y da curva de calibração obtida nos pontos próximos ao suposto limite de detecção. Já o S é a inclinação da curva de calibração.

4.4.4 PRECISÃO

A precisão é o grau de proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras de dacarbazina preparadas conforme descrito no método analítico que será posteriormente validado [40,41].

Os resultados desse teste foram determinados através da repetibilidade e da precisão intermediária. A repetibilidade foi feita em triplicata com três concentrações teóricas: 2,5; 7,5 e 12,5 µg / mL da dacarbazina, com um único analista. A precisão intermediária (inter-ensaio) também utilizou essas concentrações, porém foram feitas com dois analistas diferentes em dois dias distintos e as amostras foram analisadas pelo mesmo equipamento. Os resultados obtidos foram calculados de acordo com a equação 4:

$$CV(\%) = \frac{(\text{Desvio padrão da média})}{(\text{Concentração média})} \times 100$$

(Equação IV),

onde, CV é o coeficiente de Variação

4.4.5 EXATIDÃO

A exatidão é o grau de conformidade entre os resultados individuais do método que está sendo estudado, quando comparado ao valor dito como verdadeiro [38,40]. A exatidão do método analítico foi determinada após o cálculo da recuperação da dacarbazina no estrato córneo (EC), folículo piloso (FP) e pele remanescente (PR) da pele da orelha de suíno. Prosseguido da seguinte maneira: em 9 frascos de vidro âmbar, foram colocadas cada camada da pele em triplicata (EC,FP e PR); em seguida, foram adicionadas quantidades conhecidas de dacarbazina para se alcançar as concentrações de 2,5; 7,5 e 12,5 µg/mL após a adição de 5 mL de metanol. As amostras foram deixadas sob agitação magnética por 24h, para então se analisar na CLAE se a concentração teórica está em concordância com a encontrada. Os resultados obtidos foram calculados de acordo com a equação 5:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{concentração medida})}{(\text{concentração nominal})} \times 100$$

(Equação V)

4.4.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA ATRAVÉS DE ESTUDOS DE PERMEAÇÃO

A permeação é a difusão do fármaco por gradiente de concentração, por meio de uma membrana, para uma solução receptora onde será realizada a determinação analítica do conteúdo do fármaco permeado ao longo do tempo [40,44–47]. A avaliação da permeação permitirá a demonstração prática do método analítico produzido.

Para o estudo de permeação *in vitro*, é utilizada uma célula de difusão vertical do tipo Franz, [44]. A vidraria é dividida em dois compartimentos, o receptor e o doador de fármaco, separados pela pele de orelha de suíno.

A difusão do fármaco é verificada por meio de amostragens periódicas e seguido de quantificação do fármaco no meio receptor. O conteúdo de fármaco na pele fixada também é analisado para demonstrar a taxa de permeação e/ou retenção da pele. Esta é verificada no equipamento após a separação das três camadas da pele por *tape stripping*, técnica descrita anteriormente [44].

Figura 16. Célula de difusão do tipo Franz

Fonte: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos, 2013.



No experimento realizado, as células do tipo Franz de difusão vertical possuíam capacidades de 15 mL no compartimento receptor e 2 mL no compartimento doador (Figura 17). A área de difusão das células tinha 17 mm de diâmetro. Os fragmentos de pele foram montados de forma a separar os compartimentos doador e receptor das células de Franz. No compartimento doador foi adicionado 1 mL de solução de dacarbazina (0,1%) e o compartimento receptor foi adicionado 15 mL de tampão fosfato pH 7,4. As células foram mantidas a 32 ± 2 °C, por um banho de água, e com agitação magnética durante 6 h (Figura 18).

A solução receptora foi coletada de hora em hora e analisada para quantificação da dacarbazina (Figura 19). Em seguida, a pele foi retirada das células de Franz, a formulação foi removida com água e seu excesso foi retirado com um papel absorvente. Foi realizado o procedimento de separação das camadas da pele para extração do fármaco.

Figura 17. Permeação em célula tipo Franz

Fonte: Da autora



Figura 18. Camadas da pele sob agitação magnética

Fonte: Da autora



Figura 19. Filtração da solução extraída após agitação magnética em metanol

Fonte: Da autora



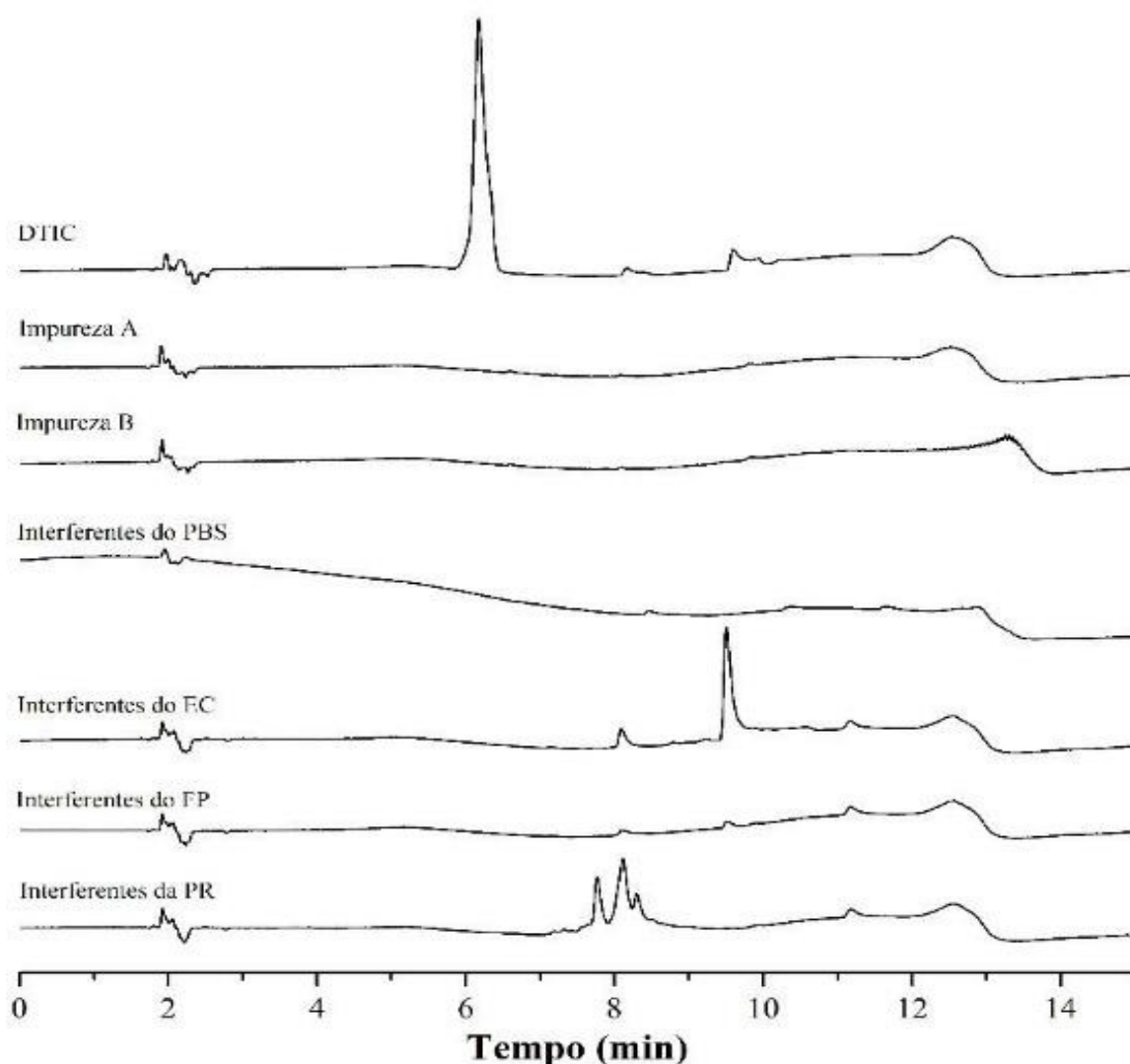
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELETIVIDADE

A validação do método analítico já foi publicada no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [1].

A seletividade desse método foi determinada pela quantificação da dacarbazina na presença de interferentes, incluindo matrizes biológicas (EC, FP e PR). A comparação entre os cromatogramas do fármaco isolado com as matrizes indicou que nenhum pico interferente foi identificado no tempo de retenção da dacarbazina (Figura 20).

Figura 20. Sobreposição dos cromatogramas dos interferentes – impurezas A (2-azahypoxanthine) e B (5-amino-4-imidazolecarboxamide), PBS e extratos da pele (EC, FP e PL) – em relação ao fármaco em metanol. DTIC – Dacarbazina; EC – estrato córneo; FP – foliculo piloso; PR – pele remanescente; PBS – tampão fosfato.



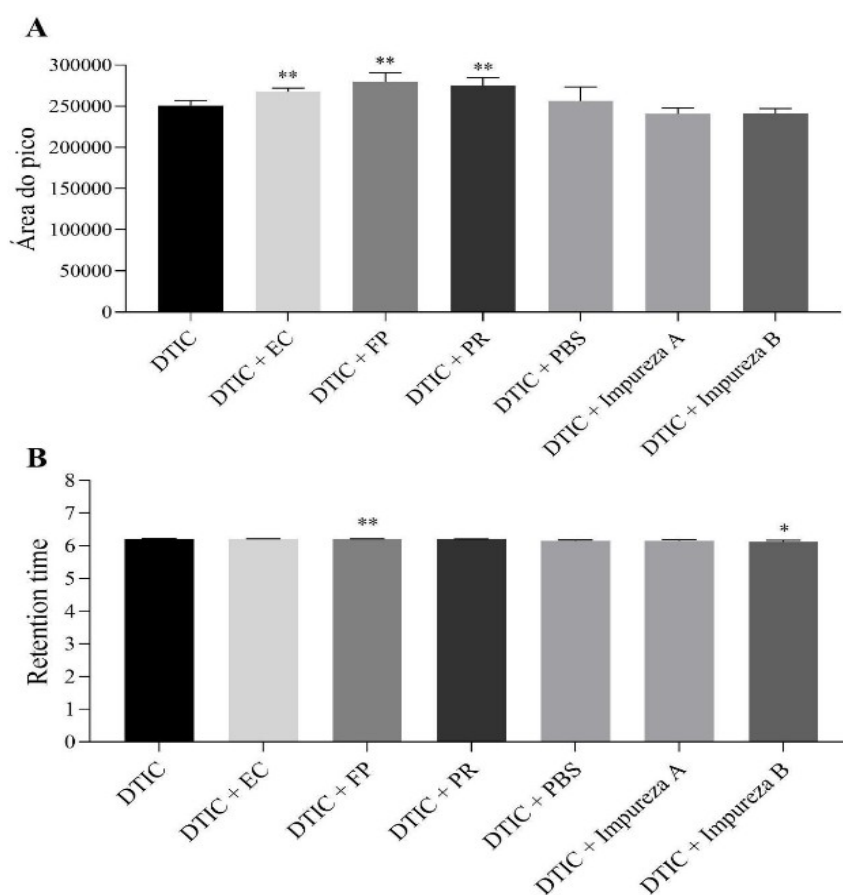
Além disso, as áreas dos picos e o tempo de retenção da dacarbazina na presença de cada matriz foram avaliados para garantir que as matrizes não afetariam a amplitude de quantificação da área do fármaco (Figura 20).

Foi analisado o tempo de retenção da dacarbazina presente na impureza A, tampão, EC e PR, em que foi observado uma diferença não significativa de $p \geq 0,05$.

Quando analisado o tempo de retenção da dacarbazina na presença do FP e da impureza B, as variações foram menores que 0,09 min, mais especificamente $p \leq 0,01$ para o FP e $p \leq 0,05$ para a impureza B.

O método se mostrou seletivo, quando foi observado que, mesmo na presença da impureza A, impureza B e tampão, a área do pico do fármaco não apresentou diferença significativa ($p \geq 0,05$). Já no EC, FP e PR, foram observadas variações de $p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente. Entretanto, por apresentarem variações menores que 4%, estão de acordo com os padrões estabelecidos pelas diretrizes do ICH (Figura 21).

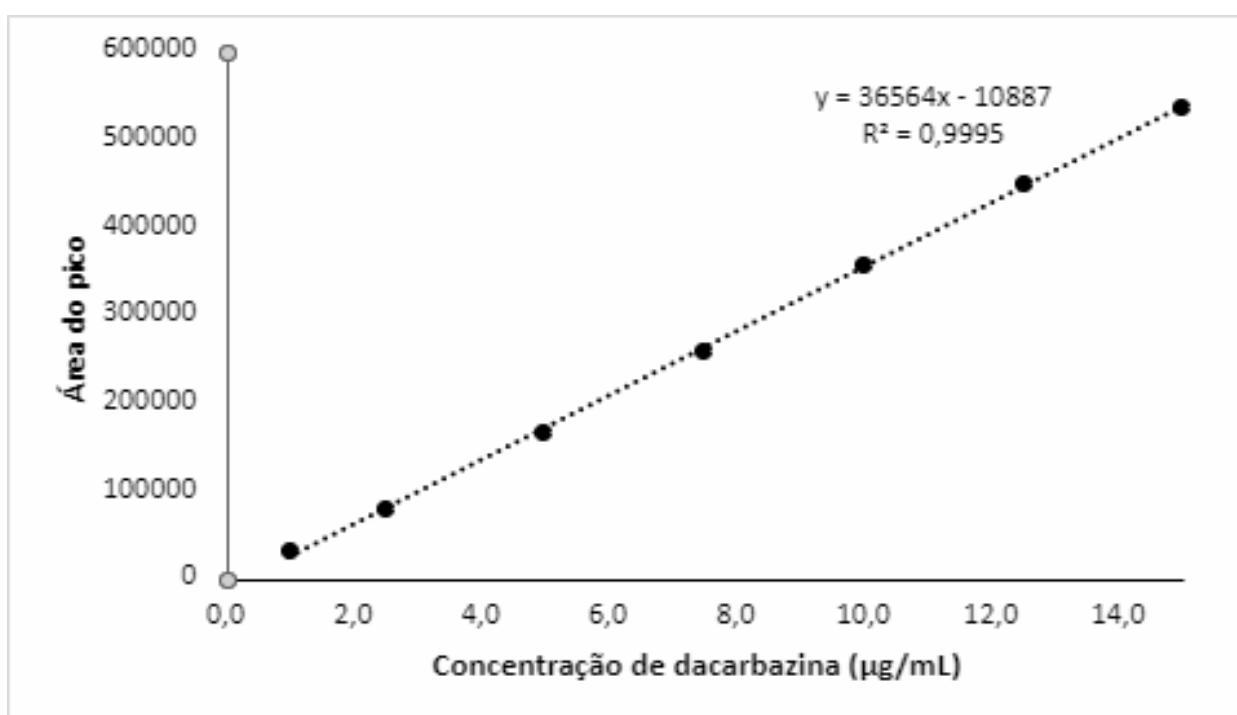
Figura 21. Ensaio de seletividade referente à Dacarbazina, às impurezas A (2-azahypoxanthine) e B (5-amino-4-imidazolecarboxamide), ao PBS e aos extratos da pele (EC, FP e PL). (A) Análise de seletividade da área do pico do fármaco em relação aos interferentes (B) Análise de seletividade do tempo de retenção do fármaco em relação aos interferentes. Análise estatística por ANOVA: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. DTIC – Dacarbazina; EC – estrato córneo; FP – folículo piloso; PR – pele remanescente; PBS – tampão fosfato.



5.2 LINEARIDADE

Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo de regressão linear obtendo a seguinte equação: $y = 36564x - 10887$, em que Y corresponde à área do pico e X a concentração do fármaco em $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22). O coeficiente de correlação (r) obtido pela regressão linear versus a concentração do analito foi de 0,9995. Assim, o valor encontrado está dentro do exigido pelas diretrizes da Anvisa e do ICH, uma vez que o coeficiente de correlação está acima de 0,99 e o coeficiente angular é diferente de zero [1].

Figura 22. Representação gráfica da curva analítica, na faixa de concentração de 1 a 15 $\mu\text{g/mL}$. Equação da reta: $y = 36564x - 10887$.



5.1 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Quando se trata do limite de detecção e de quantificação para fármacos, espera-se que os valores sejam baixos para indicar eficiência no método, uma vez que valores altos não conseguem estimar com precisão baixas concentrações do medicamento na amostra analisada [48]. O LD e o LQ foram de 0,1 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Esses valores são considerados baixos e adequados para o método proposto nesse estudo, permitindo avaliar os estudos de permeação [1-41].

5.2 PRECISÃO

A precisão do método analítico indica a capacidade de se obter resultados próximos a partir de análises repetidas e independentes, determinando que o método é reprodutível. Os resultados obtidos na repetibilidade e na precisão intermediária estão apresentados nas Tabelas 2 e 3

Tabela 2. Dados referentes à avaliação da precisão, relacionando a concentração mensurada do fármaco em termos de coeficiente de variação.

CONCENTRAÇÃO TEÓRICA ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	CONCENTRAÇÃO MENSURADA ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	CV (%)
2,5	2,34 \pm 0,03	1,11
7,5	7,37 \pm 0,01	0,14
12,5	12,49 \pm 0,02	0,16

Tabela 3. Dados referentes à avaliação da repetibilidade, relacionando a concentração mensurada do fármaco em termos de coeficiente de variação.

CONCENTRAÇÃO TEÓRICA ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	CONDIÇÕES	CONCENTRAÇÃO MENSURADA ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	CV (%)	
2,5	ANALISTA 1	DIA 1	2,6 \pm 0,1	1,52
		DIA 2	2,6 \pm 0,1	2,31
	ANALISTA 2	DIA 1	2,6 \pm 0,01	0,38
		DIA 2	2,4 \pm 0,1	2,07
7,5	ANALISTA 1	DIA 1	7,3 \pm 0,2	2,20
		DIA 2	7,4 \pm 0,3	3,60
	ANALISTA 2	DIA 1	7,5 \pm 0,3	3,81
		DIA 2	7,7 \pm 0,4	3,73
12,5	ANALISTA 1	DIA 1	12,5 \pm 0,3	1,87
		DIA 2	12,4 \pm 0,4	2,35
	ANALISTA 2	DIA 1	12,7 \pm 0,4	2,36
		DIA 2	13,2 \pm 0,1	0,83

Os CV encontrados na repetibilidade do método para a dacarbazina foram menores que 2%. Esse valor é considerado baixo e indica precisão adequada para método em qualquer concentração do analito dentro da faixa utilizada na linearidade. Na precisão intermediária os valores de CV variaram entre 0,38 e 3,81%. Em qualquer um dos casos não ultrapassou o limite definido para considerar que o método seja preciso [1-41], tornando o método resistente a pequenas variações na análise tanto para a repetibilidade, quanto para a precisão intermediária.

5.3 EXATIDÃO

Desenvolveu-se um método para se quantificar com exatidão o fármaco nas 3 camadas da pele de orelha de suíno. A exatidão foi feita para determinar se o método desenvolvido consegue extrair todo o fármaco inserido penetrado na pele [41]. Dessa forma, é possível assegurar que o equipamento consegue ter uma leitura adequada dos analitos após a aplicação tópica do fármaco na pele, uma vez que diversos componentes da pele podem interferir na análise [1-41]. Os valores da exatidão foram plotados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados referentes à avaliação da exatidão, relacionando a concentração mensurada do fármaco e sua recuperação nas camadas da pele.

CAMADA DA PELE	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	CONCENTRAÇÃO MENSURADA ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	RECUPERAÇÃO (%)
EC	2,5	$2,7 \pm 0,1$	$109,3 \pm 0,4$
	7,5	$8,0 \pm 0,3$	$106,9 \pm 4,1$
	12,5	$13,1 \pm 0,6$	$104,8 \pm 4,5$
FP	2,5	$2,8 \pm 0,1$	$112,8 \pm 3$
	7,5	$8,0 \pm 0,3$	$106,1 \pm 3,3$
	12,5	$13,2 \pm 0,6$	$105,9 \pm 4,7$
PR	2,5	$2,5 \pm 0,1$	$98,3 \pm 4,4$
	7,5	$7,0 \pm 0,2$	$93,6 \pm 2,8$
	12,5	$11,5 \pm 0,6$	$91,9 \pm 4,8$

EC – estrato córneo; FP – folículo piloso; PR – pele remanescente.

Os valores de recuperação do EC ficaram entre 104,75 e 109,30 %, do FP ficaram entre 105,87 e 112,77 % e da PR ficaram entre 91,94 e 98,27%. Esses valores de exatidão estão entre os 85-115% exigidos para métodos analíticos [41], indicando que o método obteve uma boa recuperação.

5.4 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA ATRAVÉS DE ESTUDOS DE PERMEACÃO

Com o uso de células de difusão do tipo Franz e pele suína para separação do meio receptor do doador, foram realizados testes *in vitro* de penetração, de modo a se verificar a aplicabilidade do método analítico desenvolvido, usando o fármaco em solução e em gel, durante 6 h de análise.

No compartimento receptor foram adicionados 15 mL de PBS sob agitação magnética a 32 °C. No compartimento doador, para a formulação em solução, usou-se 1 mL de solução aquosa de dacarbazina 0,1% e para a formulação em gel, usou-se 1 mL de dacarbazina a 0,1% incorporado ao gel.

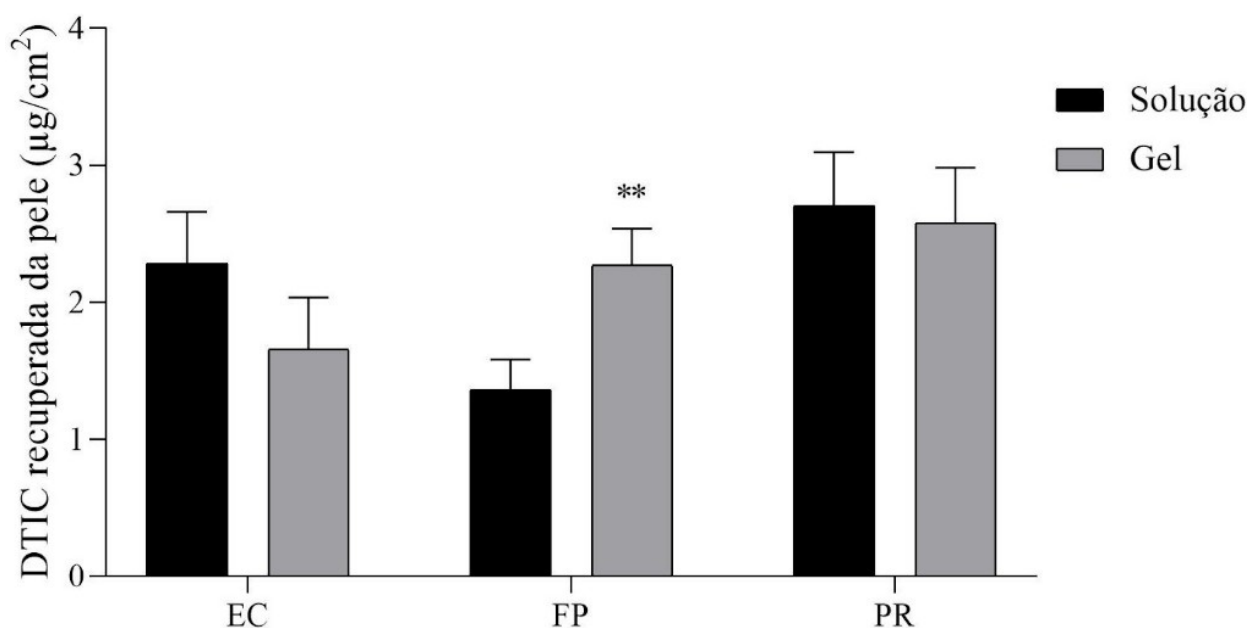
Após o tempo de 6h, a pele fixada na célula tipo Franz foi removida e limpa. As camadas da pele foram separadas e extraiu-se o fármaco presente em cada uma delas, para posterior quantificação na CLAE.

Na Figura 23, podemos observar a concentração de fármaco presente em cada camada da pele. No estudo, foi possível observar que não foi detectado a presença do fármaco no meio receptor e devido às características hidrofílicas da dacarbazina, não foram encontradas grandes quantidades do fármaco na pele. Além disso, a quantidade de dacarbazina encontrada no EC e na PR não foi diferente entre a formulação em gel e a solução aquosa ($p > 0,05$).

Entretanto, foi possível observar que houve um maior acúmulo do fármaco no FP ($p \leq 0,01$) na formulação em gel quando comparado com a solução aquosa.

Mesmo na presença de impurezas, o método analítico proposto foi capaz de detectar de maneira eficiente as variações de concentração encontradas na formulação em gel e solução aquosa, de maneira a permitir que a quantificação fosse realizada com sucesso [1].

Figura 23. Dacarbazina recuperada da pele (EC, FP e PP) após aplicação do fármaco em solução e em gel em ensaio de penetração cutânea. Análise estatística por ANOVA: ** $p \leq 0,01$. DTIC – Dacarbazina; EC – estrato córneo; FP – folículo piloso; PR – pele remanescente.



6. CONCLUSÃO

O método analítico proposto foi capaz de quantificar a dacarbazina. O método se mostrou linear, preciso, seletivo e com baixos limites de detecção e de quantificação. Além disso, o método se mostrou exato, sendo possível recuperar o fármaco e analisar com precisão e exatidão as amostras coletadas. Sendo assim, o método proposto se mostra promissor para ser aplicado em futuros estudos farmacotécnicos em novas formulações tópicas contendo a dacarbazina.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Cardoso CO, Uwai TY, Gratieri T, Cunha-Filho M, Gelfuso GM. Chromatographic method for dacarbazine quantification in skin permeation experiments. *J Pharm Biomed Anal* 2023;234:115593. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115593>.
- [2] Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil 2017:128. <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf> (accessed January 4, 2023).
- [3] Celular C. Avaliação da atividade antitumoral do composto DM-1 e da terapia de captura de nêutrons por boro em associação ao quimioterápico dacarbazina no tratamento do melanoma. 2012.
- [4] Corrêa F de M, Guerra RL, Fernandes RRA, Souza MC de, Zimmermann IR. Terapia-alvo versus dacarbazina no tratamento de primeira linha do melanoma avançado não cirúrgico e metastático: análise de impacto orçamentário na perspectiva do Sistema Único de Saúde, 2018-2020. *Epidemiol Serv Saude* 2019;28:e2018325. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742019000200013>.
- [5] Hein HL, Mohr K, Lutz. *Farmacologia. artmed*. 2017.
- [6] Naveen Kumar DR, Cijo George V, Suresh PK, Ashok Kumar R. Acceleration of pro-caspase-3 maturation and cell migration inhibition in human breast cancer cells by phytoconstituents of *Rheum emodi* rhizome extracts. *EXCLI J* 2013;12:462–78.
- [7] Cardoso CO, Ferreira-Nunes R, Cunha-Filho M, Gratieri T, Gelfuso GM. In situ gelling microemulsion for topical ocular delivery of moxifloxacin and betamethasone. *J Mol Liq* 2022;360:119559. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119559>.
- [8] C.N. Honors, C.A. Kruger, H. Abrahamse, Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: a review, *Technol. Cancer Res. Treat.* 17 (2018) 1–15.
- [9] M.N. Leite, J.S.R. Viegas, F.S.G. Praça, N.A. de Paula, L.N.Z. Ramalho, M.V.L. B. Bentley, et al., Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine, *Eur. J. Pharm. Sci.* 160 (October 2020) (2021).

- [10] A. Uchida, H. Ohtake, Y. Suzuki, H. Sato, Y. Seto, S. Onoue, et al., Photochemically stabilized formulation of dacarbazine with reduced production of algogenic photodegradants (Available from), *Int. J. Pharm.* 564 (May) (2019) 492–498,
- [11] Liu Y, Zhang W, Yang Y. Validated hydrophilic interaction LC-MS/MS method for simultaneous quantification of dacarbazine and 5-amino-4-imidazole-carboxamide in human plasma. *Talanta* 2008;77:412–21. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.004>.
- [12] Yuhua Y, Bingjun Z, Jiayuan A, Shun F. [Determination of dacarbazine in the urine of mice with melanoma by high performance liquid chromatography]. *Se Pu* 2020;38:1302–7. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1123.2020.01003>.
- [13] Marchiori Bakos R, Brandao MA, Munhoz R, Mendonça Do Nascimento M. Informações gerais sobre o melanoma. *Informações Gerais Sobre o Melanoma* n.d. <https://gbm.org.br/o-melanoma/> (accessed November 12, 2023).
- [14] O que é melanoma? - Melanoma Metastático. Saúde Novartis, 26/02/2017. Disponível em: <https://saude.novartis.com.br/melanoma-metastatico/o-que-emelanoma/>. Acesso em maio. 2023.
- [15] Rebecca I. Hartman MD, MPH JYLM. Melanoma Cutâneo – Uma Revisão em Detecção, Estadiamento e Tratamento 2018:14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.09.005>.
- [16] Ministério da Saúde. *Classificação de Tumores Malignos*. 2004.
- [17] Freedber I, Eisen A, Wolff K, Austen K, Goldsmith L, Katz S. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6th Editio. McGraw-Hill Professional; 2003.
- [18] Burns D, George J, Aucoin D, Bower J, Burrell S, Gilbert R, et al. The Pathogenesis and Clinical Management of Cutaneous Melanoma: An Evidence-Based Review. *J Med imaging Radiat Sci*. 2019 Sep;50(3):460-469.e1
- [19] Canadian Cancer Society. *Melanome*. 2019

[20] Callender GG, Egger ME, Burton AL, Scoggins CR, Ross MI, Stromberg AJ, et al. Prognostic 47 implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1 mm or thicker. *Am J Surg*. 2011 Dec;202(6):655–9

[21] Balch CM, Soong S, Gershenwald JE, Thompson JF, Coit DG, Atkins MB, et al. Age as a prognostic factor in patients with localized melanoma and regional metastases. *Ann Surg Oncol*. 2013 Nov;20(12):3961–8.

[22] Thompson JF, Soong S-J, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Jun;29(16):2199–205.

[23] Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson WE 3rd, Daud A, et al. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Melanoma , version 2.2013: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr CAnc Netw*. 2013;11:395-407.

[24] Rossi CR, Seno A, Vecchiato A, Foletto M, Tregnaghi A, De Candia A, et al. The impact of ultrasound scanning in the staging and follow-up of patients with clinical stage I cutaneous melanoma. *Eur J Cancer* 1997;33:200-3.

[25] Bafounta ML, Beauchet A, Chagnon S, Saiag P. Ultrasonography or palpation for detection of melanoma nodal invasion: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 2004;5:673-80.

[26] RAMOS, Leonor Isabel Castendo. Tratamento do melanoma maligno. Serviço de Dermatovenereologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, 2009. Disponível em :<<https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/27704/2/Tratamento%20MMpdf.pdf>>. Acesso em maio. 2023.

[27] IMMUNOTHERAPY for Melanoma Skin Cancer. American Cancer Society, 19/05/2018. Disponível em:<<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skinancer/treating/immunotherapy.html>>. Acesso em set. 2018.

- [28] RAMOS, Anderson dos Santos et al. Avanços e implicações da imunoterapia no melanoma: uma revisão. Editora Realize, Campina Grande, 2017. II Conbracis – Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde. Disponível em:<https://editorarealize.com.br/revistas/conbracis/trabalhos/TRABALHO_EV071_MD1_SA12_ID597_01052017151949.pdf>. Acesso em set. 2018.
- [29] Huncharek M, Caubet JF, McGarry R0. Single-agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. *Melanoma Res.* 2001;11:75–81.
- [30] Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, Giri TK, Saraf S, Tripathi DK. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release.* 2012;164(1):26-40. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.09.017.
- [31] Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Deliv.* 2006;13(3):175-87. doi: doi:10.1080/10717540500455975.
- [32] Karande P, Mitragotri S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Biomembranes.* 2009;1788(11):2362- 73. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.08.015>.
- [33] LOYD V. ALLEN JR., NICHOLAS G. POPOVICH HCA. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 9th ed. 2013.
- [34] MATOS BN. DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COMO ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A PENETRAÇÃO FOLICULAR DO MINOXIDIL SULFATO NO TRATAMENTO DA ALOPECIA ANDROGÊNICA. Universidade de Brasília, 2014.
- [35] Siqueira G. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 8 Janeiro 2019 2019. <https://a3analitica.com.br/bloga3pharma/2019/01/08/principios-de-cromatografia-a-liquido-hplc/> (accessed September 15, 2023).

- [36] Sadjadi S. Por que a C18 é a Fase Estacionária mais Popular para a Fase Reversa? ALLCROM 2023. <https://www.allcrom.com.br/por-que-a-c18-e-a-fase-estacionaria-mais-popular-para-a-fase-reversa/> (accessed August 20, 2023).
- [37] Cromatografia Líquida (HPLC/LCMS) n.d. <https://www.antteknik.com/en/products/?p=prominence-lc-20a-modular-hplc-system> (accessed July 23, 2023).
- [38] Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de Julho de 2017. Ministério da Saúde, vol. 2017, 2017, p. 1–21.
- [39] Stefanini-Oresic L. Validation of analytical procedures: ICH guidelines Q2(R2). *Farm Glas* 2022;2:1–34.
- [40] Guy RC. European Medicines Agency ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* 2014;2:1070–2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7>.
- [41] *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Food and Drug Administration*; 2015.
- [42] Ferreira-nunes R, Aliel E, Almeida T De. Liquid chromatography – mass spectrometry for simultaneous determination of spironolactone and canrenone in plasma samples 2023.
- [43] Fiore D, Jackson AJ, Didolkar MS, Dandu VR. Simultaneous determination of dacarbazine, its photolytic degradation product, 2-azahypoxanthine, and the metabolite 5-aminoimidazole-4-carboxamide in plasma and urine by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:977–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.27.6.977>.
- [44] Jr. LVA, Popovich NG, Ansel HC. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. (9ª edição). Grupo A; 2013.
- [45] Quintão WSC, Ferreira-Nunes R, Gratieri T, Cunha-Filho M, Gelfuso GM. Validation of a simple chromatographic method for naringenin quantification in skin permeation

experiments. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2022;1201–1202.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123291>.

[46] Reis TA, Jaculi AE, Alves RDC, Gratieri T, Azevedo RB, Joanitti GA, et al. Simple and Selective HPLC-UV/Vis Bioanalytical Method to Determine Aluminum Phthalocyanine Chloride in Skin Permeation Studies. *J Anal Methods Chem* 2018;2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/7423764>.

[47] Oliveira PM, Sampaio TR, França LCF, Gratieri T, Cunha-Filho M, Gelfuso GM. LC–MS bioanalytical method for simultaneous determination of latanoprost and minoxidil in the skin. *J Pharm Biomed Anal* 2020;187. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113373>.

[48] Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. Elsevier 2007;165:21624.<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>

