

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO
ALUMÍNIO-CLORO FTALOCIANINA PARA APLICAÇÃO NA TERAPIA
FOTODINÂMICA DO CÂNCER DE PELE

ELLEN DENISE PRADO ALMEIDA

São Cristóvão

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO
ALUMÍNIO-CLORO FTALOCIANINA PARA APLICAÇÃO NA TERAPIA
FOTODINÂMICA DO CÂNCER DE PELE

ELLEN DENISE PRADO ALMEIDA

Dissertação apresentada ao núcleo de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal
de Sergipe como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Ana Amélia Moreira Lira

São Cristóvão

2014

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A447d Almeida, Ellen Denise Prado
Desenvolvimento de partículas lipídicas contendo alumínio-cloro
ftalocianina para aplicação na terapia fotodinâmica do câncer de
pele / Ellen Denise Prado Almeida ; orientadora Ana Amélia
Moreira Lira. – São Cristóvão, 2015.
83 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)–
Universidade Federal de Sergipe, 2015.

1. Pele - Câncer. 2. Fotoquimioterapia. 3. Materiais
nanoestruturados. I. Lira, Ana Amélia Moreira, orient. II. Título.

CDU 615.831

ELLEN DENISE PRADO ALMEIDA

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO
ALUMÍNIO-CLORO FTALOCIANINA PARA APLICAÇÃO NA TERAPIA
FOTODINÂMICA DO CÂNCER DE PELE

Dissertação apresentada ao Núcleo de
Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal de Sergipe como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 25/02/2014

Orientador: Prof. Dr^a. Ana Amélia Moreira Lira

1º Examinador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araujo

2º Examinador: Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento

PARECER

Dedico este trabalho aos meus pais, pela dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida, nesta minha caminhada e realização de mais uma conquista.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive

Ricardo Reis
(Heterônimo de Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

“Sejam fortes e corajosos. Não tenham medo nem fiquem apavorados por causa delas, pois o Senhor, o seu Deus, vai com vocês; nunca os deixará, nunca os abandonará”

Deuteronômio 31:6

Agradeço primeiramente a Deus por permitir que eu realizasse mais uma conquista. Sempre me guiando, protegendo e iluminando os caminhos por onde devo seguir. Obrigada Senhor, pela constante presença em minha vida.

Aos meus pais, por possibilitarem a oportunidade de realizar meus sonhos. Obrigada pelos esforços para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos por mostrarem que a vida sempre pode ser mais fácil. A mais nova integrante da família, Maria Eduarda, que será motivo de felicidade para todos.

Aos tios e primos que sempre me incentivaram a seguir com meus objetivos.

Ao meu noivo, por me apoiar na realização deste sonho, estar ao meu lado nos momentos das conquistas e frustrações. A minha sogra e cunhados, que com certeza foram muito importantes nesta caminhada.

A minha orientadora Professora Dra. Ana Amélia, pela orientação e ensinamentos não só nesses 2 anos de Mestrado, mas pelos 6 anos (até agora) de pesquisa. Obrigada principalmente pela confiança. Foram muitos aprendizados para a ciência e para a vida.

Ao Professor Dr. Victor Hugo, por sempre estar disposto a ouvir, discutir resultados e contribuir nas pesquisas.

Aos Professores Dr. Mário Ernesto, Dr. Joatan e Dra. Rogéria, por todo o auxílio que possibilitaram a realização de experimentos.

A todos do LADEF pelo apoio e amizade. Daiane, Júlio, Leandro, Juliana Joyce, Quênia, Kelven, Marcela, Adriana por toda a colaboração e incentivo em diversos momentos. Ex-vizinhos Francis e Jorge, apesar da distância, sei da torcida e que posso contar com vocês.

Aos amigos Alyne, Sarah, Dani e Clio, pela amizade fortalecida nesse período. Todas as conversas, todas as palavras de incentivo e apoio. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos nesses 2 anos.

A todos do Núcleo de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFS.

Ao CNPq/MCT pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1- CÂNCER DE PELE.....	20
2.2- TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD).....	24
2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES	27
2.4- FTALOCIANINAS.....	32
2.5- NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (NL)	36
3. OBJETIVOS.....	41
3.1- OBJETIVO GERAL	41
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4. MATERIAL.....	42
5. METODOLOGIA	43
5.1- PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO ALCLPc	43
5.2- CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS SISTEMAS OBTIDOS	44
5.2.1- TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA.....	44
5.2.2- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	44
5.2.3- DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E TEOR	45

5.3- ANÁLISE TÉRMICA	46
5.4- ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)	47
5.4- AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTROLE.....	47
5.5- ESTUDO IN VITRO DE PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO CUTÂNEA.....	47
5.6- ESTUDO IN VIVO DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA	49
5.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 49
6.1- TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	49
6.2- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	51
6.3- EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E TEOR	52
6.4- ANÁLISE TÉRMICA	53
6.5- ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO - SAXS.....	59
6.6- ESTUDO IN VITRO DE PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO CUTÂNEA.....	61
6.6.1 – AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTROLE	61
6.6.2 – AVALIAÇÃO IN VITRO DA PENETRAÇÃO/PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA ALCLPc	63
6.7- ESTUDO IN VIVO DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA.....	65
 7. CONCLUSÃO	 68
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A estrutura da Pele	20
Figura 2.	Principais estágios da TFD.....	25
Figura 3.	Representação esquemática dos importantes fatores para morte celular mediada pela TFD	27
Figura 4.	Estrutura do fotossensibilizador Photofrin® na forma de éter.....	29
Figura 5.	Esquema do ALA como precursor do PPIX.....	30
Figura 6.	Estrutura química das ftalocianinas metálicas	33
Figura 7.	Estrutura química do Photosens®.....	34
Figura 8.	Estrutura química da AICIPc.....	36
Figura 9.	Representação de uma nanopartícula lipídica sólida.....	37
Figura 10.	Imagens de MET das nanopartículas preparadas. (A): NLS inerte; (B): NLS-AICIPc; (C): CLN 20; (D): CLN 40	52
Figura 11.	Curvas de DSC do AE, NLS inerte, NLS-AICIPc, CLN 20 e CLN 40.....	55
Figura 12.	Curva de DSC do ácido esteárico recristalizado em etanol.....	56
Figura 13.	Curva de DSC da AICIPc.....	57
Figura 14.	Curvas de SAXS do AE, AICIPc e NL liofilizadas	59
Figura 15.	Representação esquemática da estrutura lamelar do Ácido Esteárico.....	60
Figura 16.	: Espectros de absorção na região UV-VIS da AICIPc em diferentes solventes na concentração de 2µg/mL.....	62
Figura 17:	Retenção Cutânea de AICIPc da Formulação Controle e das dispersões lipídicas. A quantidade acumulada de AICIPc no EC e na epiderme	

está representada como média +/- desvio padrão, para n=3 amostras. Para EC: **p < 0,01 vs Controle; #p < 0,05 vs NLS-AICIPc. Para epiderme: &p < 0,01 vs Controle; @p < 0,01 vs CLN 40 (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).....**65**

Figura 18: Imagens de Microscopia de Fluorescência da Penetração Cutânea da AICIPc veiculada em: A) Formulação Controle; B) NLS-AICIPc; C) CLN 20 e D) CLN 40.....**67**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição das Nanopartículas Lipídicas desenvolvidas.....	44
Tabela 2.	Caracterização por tamanho médio, Índice de Polidispersividade (IPD) e Potencial Zeta das Nanopartículas Lipídicas desenvolvidas.....	51
Tabela 3.	Caracterização por Eficiência de Encapsulação e Teor das Nanopartículas Lipídicas desenvolvidas.....	53
Tabela 4.	T_{onset} e Pico máximo e Entalpia de fusão, e Índice de Recristalização do AE, NLS inerte, NLS-AICIPc, CLN 20, CLN 40	55
Tabela 5.	Parâmetros de espalhamento obtidos nas curvas de SAXS.....	60
Tabela 6.	Caracterização Fotofísica da AICIPc em diferentes solventes.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Ácido Esteárico
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AlClPc	Alumínio-Cloro Ftalocianina
AO	Ácido Oléico
CCB	Carcinoma de Células Basais
CCE	Carcinomas de Células Escamosas
CCP	Cloreto de Cetilpiridíneo
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EC	Estrato Córneo
EE	Eficiência de Encapsulação
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H ₂ O	Água
IR	Índice de Recristalização
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAL	Metil 5-aminolevulínico
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NL	Nanopartículas Lipídicas
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
PEG 300	Polietilenoglicol 300

PPIX	Protoporfirina IX
PTA	Ácido Fosfotúngstico
SAXS	Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo
SDS	Lauril Sulfato de Sódio
TFD	Terapia Fotodinâmica
TG	Termogravimetria
UV-VIS	Região do Ultravioleta e do Visível

RESUMO

O câncer de pele é o tumor maligno mais comum em todo o mundo e o não melanoma é um dos tipos de câncer mais tratáveis. Contudo, atualmente não existe um tratamento ideal do câncer de pele, e a cirurgia ainda é defendida como primeira opção no procedimento para tratar as lesões cancerígenas na pele. A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste na administração e acúmulo de um fármaco fotossensibilizador no tecido-alvo, seguido da exposição a uma fonte de luz de comprimento de onda apropriado, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio responsáveis por causar danos às células cancerígenas. As Nanopartículas Lipídicas (NL) oferecem um atrativo sistema para liberação de fármacos lipofílicos como a Alumínio-Cloro Ftalocianina (AlClPc) para a utilização na TFD do câncer de pele. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar Nanopartículas Lipídicas AlClPc para posterior aplicação no tratamento de câncer de pele através da Terapia Fotodinâmica. Foram preparadas Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) com 20 e 40% de Ácido Oléico (AO) através do método da difusão de solvente em fase aquosa, utilizando Ácido Esteárico (AE) como lipídio sólido e AO como lipídio líquido. A caracterização foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), diâmetro médio de partícula, potencial zeta, eficiência de encapsulação (EE), teor de fármaco e análise térmica, através da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os estudos de penetração *in vitro* foram realizados em células de difusão do tipo Franz utilizando pele de orelha de porco como membrana. A distribuição da AlClPc nas camadas da pele foi visualizada através de microscopia de fluorescência nos estudos *in vivo* utilizando camundongos Hairless. As NL desenvolvidas apresentaram tamanho nanométrico com altos valores de potencial zeta e forma relativamente esférica e a incorporação de AO promoveu o aumento da EE e teor atingindo valores de 95,8% e 4%, respectivamente. Na análise térmica foi evidenciada a presença de polimorfismo do AE, decorrente do processo de fusão e recristalização do lipídio. Nos estudos de penetração *in vitro*, a AlClPc não foi detectada no meio receptor, ficando retida no EC e nas camadas da pele e foi evidenciada a capacidade de penetração das formulações desenvolvidas, já que a quantidade de AlClPc retida na pele foi significativamente maior ($p < 0,01$) em relação à formulação controle. A formulação com 40% de AO (CLN 40) apresentou quantidade de fármaco retida nas camadas da pele significativamente maior ($p < 0,01$) em relação às demais formulações, sugerindo o efeito promotor do AO, além do favorecimento do transporte da AlClPc para camadas mais profundas da pele, devido ao menor tamanho de partícula desta formulação. De acordo com os resultados obtidos os sistemas desenvolvidos podem ser promissores para a veiculação da AlClPc no tratamento do câncer de pele através da TFD.

Palavras-chave: Câncer de pele, Terapia Fotodinâmica, Alumínio-Cloro Ftalocianina, Nanopartículas Lipídicas Sólidas, Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

ABSTRACT

Skin cancer is the malign tumor most common worldwide and nonmelanoma is the kind of cancer most treatable. However, nowadays there is not a ideal treatment of the skin cancer and the surgery is the therapeutic standard for treatment of malign lesion in the skin. Photodynamic therapy (PDT) consists of the administration and accumulation of photosensitizers in target cells, followed by exposure to a light source with appropriate wavelength, resulting in the formation of oxygen reactive species, responsables for causing damage to cancerous cells. Lipid nanoparticles (LN) offer an attractive system for delivery of lipophilic drugs such as Chloroaluminium Phthalocyanine (CIAIPc) for use in PDT of skin cancer. The objective of this work was develop and characterize LN containing CIAIPc for subsequent application to the treatment of skin cancer by PDT. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) were prepared with 20 and 40% of Oleic Acid (OA) by the method of diffusion in aqueous solvent, using Stearic Acid (SA) as solid lipid and OA as liquid lipid. The characterization was performed by Transmission Electronic Microscopy (TEM), particle size, zeta potential, entrapment efficiency (EE), drug loading and thermal analysis by Differential Scanning Calorimetry (DSC). The *in vitro* penetration studies were performed in modified Franz diffusion cells using pig ear skin as membrane model. The distribution of CIAIPc in the skin layers was visualized by fluorescence microscopy using mice hairless in the *in vivo* studies. The LN presented nanometric size with high values of zeta potential and relatively spherical shape and the incorporation of OA promoted the increase of EE and drug loading reaching values of 95.8% and 4%, respectively. The thermal analysis showed the presence of polymorphism, due to the process of melting and recrystallization of the lipid. *In vitro* penetration studies, CIAIPc was not detected in receptor medium, being retained in stratum corneum and skin layers and showed the penetration ability of the formulations developed, since the amount of CIAIPc retained on the skin was significantly higher ($p < 0,01$) compared the control formulation. The formulation with 40% AO (NLC 40) showed amount of drug retained in the skin significantly higher ($p < 0,01$) compared to other formulations, demonstrating the enhancer effect of penetration of the OA, besides favoring the transport of CIAIPc to deeper layers of the skin, due to the smaller particle size of this formulation. According to the results obtained, the systems developed may be promising for the incorporation of AICIPc in the treatment of skin cancer by PDT.

Keywords: Skin cancer, photodynamic therapy, chloro-aluminium phthalocyanine, solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carrier

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a incidência do câncer de pele, tanto do tipo melanoma quanto do não melanoma, tem aumentado. Atualmente, entre 2 e 3 milhões de pessoas desenvolvem câncer de pele do tipo não melanoma e 132.000 o tipo melanoma em todo o mundo. A cada três cânceres diagnosticados, um é câncer de pele (WHO, 2013).

Já é amplamente demonstrado que a radiação ultravioleta está envolvida na gênese de carcinomas através de uma complexa interação de fatores, tais como duração e frequência de exposição (SANCHÉZ *et al.*, 2012). Dados epidemiológicos indicam que a excessiva ou cumulativa exposição solar ocorrem anos antes do surgimento do câncer de pele (COBANOGLU *et al.*, 2012). Devido à falta de pigmentação na pele, populações caucasianas têm um risco maior de adquirir câncer de pele do que as pessoas de pele escura, que podem tolerar com segurança níveis relativamente altos de exposição solar sem queimar a pele e sem aumentar o risco para o câncer de pele (WHO, 2013).

As opções para o tratamento do câncer de pele podem ser classificadas em não cirúrgicas e cirúrgicas. O objetivo é sempre remover o tumor, atingir alto índice de cura, preservar o tecido local o máximo possível e produzir resultados estéticos satisfatórios. O tratamento tradicional requer a remoção cirúrgica do tumor, outras opções cirúrgicas são a cirurgia micrográfica de Mohs, curetagem e eletrodessecação (CHUMMUN; LEAN; 2011). Porém são técnicas ainda menos aceitas esteticamente pelos pacientes quando comparadas à remoção cirúrgica (HANSEN; ANDERSON, 2013), levando a uma constante busca por técnicas não cirúrgicas e não invasivas para o tratamento do câncer de pele (MADAN *et al.*, 2010).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma tecnologia relativamente nova no tratamento do câncer e está associada a poucos efeitos colaterais (CAI *et al.*, 2013) e já foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da queratose actínica não hipertrófica da cabeça e do couro

cabeludo (GALICZYNSKI; VIDIMOS, 2011). Também pode ser usada no tratamento de várias outras dermatoses bem como do câncer de pele do tipo não melanoma e tem se tornado uma alternativa emergente para tumores não agressivos (GALICZYNSKI; VIDIMOS, 2011). Esta terapia geralmente envolve a interação entre um fármaco fotossensibilizador, oxigênio no tecido lesionado e irradiação de luz no local do tratamento (HAMDOON *et al.*, 2011).

A alumínio-cloro ftalocianina (AlClPc) possui propriedades fotofísicas favoráveis para aplicação na terapia fotodinâmica do câncer de pele (SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2010) e como a maioria dos fotossensibilizadores desta classe, é uma molécula hidrofóbica e para isso é necessário um sistema de liberação para que seja possível a veiculação e proteção deste fármaco, evitando a sua agregação (CHATTERJEE *et al.*, 2008).

As Nanopartículas Lipídicas (NL) estão sendo amplamente estudadas como sistemas de liberação de fármacos. Nas Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), o óleo de uma emulsão o/a é substituído por um lipídio sólido ou por uma mistura de lipídios sólidos o que torna sólida a matriz da nanopartícula tanto a temperatura ambiente quanto corporal (WEBER *et al.*, 2013). As NLS fornecem vantagens como estabilidade física, proteção, de fármacos contra degradação, liberação controlada e a utilização de lipídios bem tolerados fisiologicamente (WISSING *et al.*, 2004). Porém, possuem desvantagens como baixa capacidade de veiculação de fármacos e sua expulsão devido à transição polimórfica durante o período de armazenamento (WISSING *et al.*, 2004).

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) foram desenvolvidos como a segunda geração desses sistemas lipídicos com o propósito de superar as desvantagens apresentadas pelas NLS (CIRRI *et al.*, 2012). São compostos por uma mistura de lipídios sólidos e líquidos dispersa em uma solução aquosa de tensoativo (VITORINO *et al.*, 2013). Por serem compostos de lipídios biodegradáveis e biocompatíveis, esses sistemas diminuem a toxicidade aguda e crônica (MÜLLER *et al.*, 2000; JOSHI; MÜLLER, 2009), sendo, desta forma, um sistema carreador promissor para a veiculação da AlClPc e aplicação da TFD do câncer de pele.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1- CÂNCER DE PELE

O câncer de pele é o tumor maligno mais comum em todo o mundo e sua incidência tem aumentado (GREINERT, 2009; GORDON, 2013), o que leva a um grande problema devido ao impacto com os custos nos sistemas de saúde (GREINERT, 2009). O padrão e as taxas de incidência variam significativamente de acordo com a etnia e a localização geográfica (MUFTI, 2012).

A pele é composta de duas camadas primárias, epiderme e derme, que sobrepõe o tecido adiposo subcutâneo (Figura1). A epiderme é um epitélio escamoso estratificado derivado do ectoderma e é composta de quatro principais tipos de células: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (ZHANG; OBAGI, 2009). O câncer de pele ocorre quando há a desregulação na proliferação que envolve essas células (HALEM; KARIMKHANI, 2012).

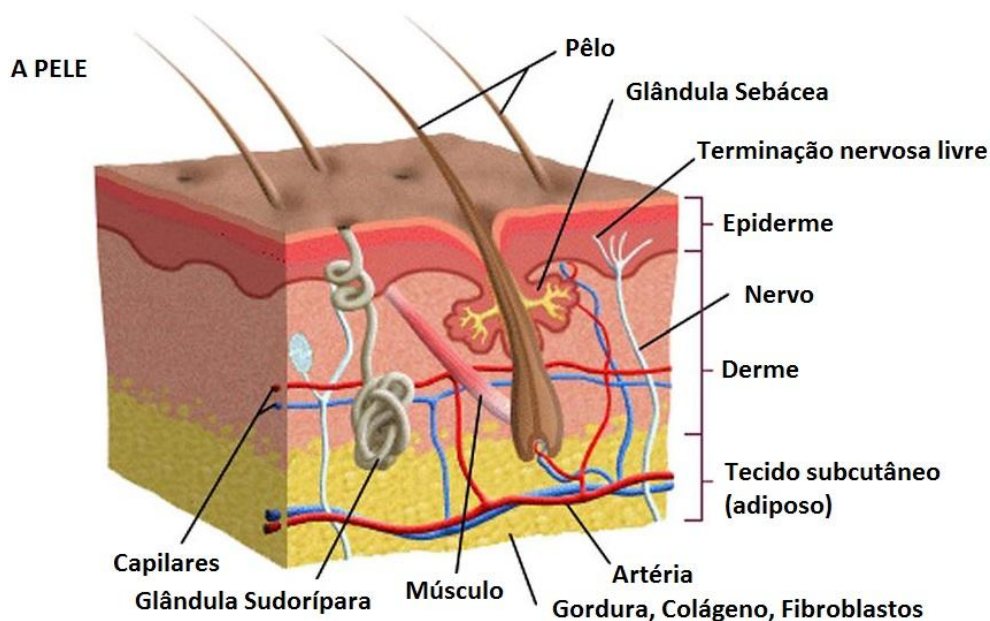


Figura 1: A estrutura da pele. (adaptado de ZHANG; OBAGI, 2009)

Existem dois principais subtipos para o câncer de pele: o melanoma cutâneo e o câncer de pele não melanoma (CAKIR *et al.*, 2012; HALEM; KARIMKHANI, 2012). O melanoma é um tumor maligno dos melanócitos, células produtoras de melanina, e pode ocorrer em qualquer tecido que contenha estas células (CUMMINS *et al.*, 2006; INGRAFFEA, 2013). Embora o câncer de pele do tipo melanoma seja o tipo menos frequente, causa cerca de 75% das morte por câncer de pele (CALIFANO; NANCE, 2009).

O câncer de pele, especialmente o não melanoma, é um grande problema nos dias atuais com mais de 100.000 diagnósticos por ano (HAMDOON *et al.*, 2011). No Brasil, o tipo não melanoma, é o câncer mais frequente e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Porém, apesar da elevada incidência, é o tumor de mais baixa mortalidade. A estimativa de novos casos, no Brasil, para 2012 foi de 134.170 e 1.521 mortes notificadas em 2010 (INCA, 2013).

Existem dois subtipos para o câncer de pele não melanoma, o carcinoma de células basais (CCB) e o carcinoma de células escamosas (CCE), onde a incidência do primeiro é maior que a do segundo, e as taxas são maiores em homens do que em mulheres em ambos os tipos (CAKIR *et al.*, 2012). O CCB é o mais comum tumor maligno em humanos e deriva de células não queratinizadas originadas na camada basal da epiderme (SHARQUIE; NOAIMI, 2012).

A maior parte dos carcinomas de células basais surge após a exposição de radiação ultravioleta e é mais comum na cabeça e pescoço (HALEM; KARIMKHANI, 2012). Este carcinoma cresce lentamente, tem baixo potencial de metástase e está associado à baixa mortalidade, contudo, alguns subtipos podem ser muito agressivos e destrutivos, com alta taxa de reincidência após o tratamento (MADAN *et al.*, 2010; LAZARETH, 2013).

As lesões do CCE surgem a partir da exposição solar e não apresentam invasão profunda da derme, têm baixo risco de reincidência ou metástase. Estas lesões incluem as lesões superficiais que são limitadas à epiderme

(LAZARETH, 2013). Porém um subconjunto deste carcinoma é biologicamente mais agressivo e tem grande possibilidade de reincidência, espalhamento linfático, progredir para a metástase e pode ser fatal (NUÑO-GONZÁLEZ *et al.*, 2012; HALEM; KRIMKHANI, 2012; GORDON, 2013).

O principal fator de risco, já reconhecido, que induz o desenvolvimento do câncer de pele é a exposição à radiação ultravioleta (ARMSTRONG; KRICKER, 2001; GREINERT, 2009; GREINERT; BONIOL, 2011). Contudo, existem diversos fatores sociais, econômicos, geográficos, genéticos e fenotípicos que podem modificar o risco de desenvolvimento dos carcinomas (ENGLISH *et al.*, 1998; SANCHEZ; NOVA, 2013). Já se sabe que nos primeiros estágios, o câncer de pele pode ser curado com um bom prognóstico, além disso, este tipo de câncer pode ser combatido por meio da prevenção, já que o principal fator de risco é a exposição solar (GREINERT, 2009). A prevenção primária pode ser realizada pela informação e educação da população sobre os riscos da exposição aos raios ultravioleta. A prevenção secundária está associada a detecção precoce do câncer ou das lesões pré-cancerosas a fim de encontrar os primeiros estágios da malignidade para que possam ser curados com bons prognósticos (GREINERT, 2009; GREINERT; BONIOL, 2011).

O câncer de pele não melanoma é um dos tipos de câncer mais tratáveis (HALEM; KARIMKHANI, 2012). Contudo, as lesões mais avançadas requerem tratamentos mais prolongados. O tratamento deste carcinoma visa à completa erradicação do tumor com a preservação das estruturas adjacentes, prevenção da ulceração, da desfiguração mais grave da pele e da invasão do tumor na camada subcutânea, nervos, músculos, cartilagens e ossos (ERMERTCAN *et al.*, 2012; LAZARETH, 2013).

Os tratamentos tradicionais para o câncer de pele não melanoma, cirúrgicos e não cirúrgicos, incluem a terapia tópica, criocirurgia, radioterapia, curetagem e eletrodessecação (HALEM; KARIMKHANI, 2012; LAZARETH, 2013). Para a terapia tópica existem dois medicamentos já aprovados pela FDA, o 5-fluorouracil e o Imiquimod, porém, segundo LOVE *et al.*, 2009,

baseado em evidências disponíveis, o uso desses medicamentos no tratamento do tumor é fraco. Ambos os medicamentos causam eritema e inflamação da área tratada e os pacientes devem ser monitorados para uma terapia adequada (COUNCIL, 2013). A crioterapia envolve a destruição tecidual pela diminuição extrema da temperatura, com a aplicação de nitrogênio líquido, cristalizando as células tumorais (ERMERTCAN *et al.*, 2012; LAZARETH, 2013). É um procedimento rápido e de baixo custo, porém, causa hipopigmentação ou cicatrizes (LAZARETH, 2013), o que resulta em uma não aceitação estética dos pacientes, quando comparada a outras modalidades de tratamento, como a TFD (GALICZYNSKI; VIDIMOS, 2011). A radioterapia utiliza radiação ionizante no tratamento do câncer e expõe o paciente ao risco de um segundo carcinoma na região irradiada (ERMERTCAN *et al.*, 2012). Pode ser utilizada em pequenos carcinomas ou em lesões maiores, quando a cirurgia oferecer risco, e ocasionar em prejuízo funcional, ou não apresente resultados estéticos aceitáveis pelo paciente (ERMERTCAN *et al.*, 2012). Com o avanço das técnicas cirúrgicas, os pacientes são tratados com radioterapia somente quando a lesão está em estágio avançado e não pode ser submetido à cirurgia (KWAN *et al.*, 2004), embora o uso desta técnica seja limitado devido ao risco de ocasionar efeitos adversos (HALEM; KARIMKHANI, 2012). A eletrodessecação é uma técnica de fácil realização e esteticamente aceitável (HALEM; KARIMKHANI, 2012). Utiliza corrente elétrica de alta voltagem e baixa amperagem para promover a destruição superficial da lesão (HALEM; KARIMKHANI, 2012). A eletrodessecação e a curetagem são procedimentos minimamente invasivos e rápidos, contudo, aplicados apenas a um pequeno grupo de malignidades, devido à limitada acessibilidade do tumor com o instrumento não cirúrgico da técnica e à falta de análises histológicas para confirmar a remoção do tumor. Além disso, alguns pacientes consideram estas técnicas menos aceitáveis esteticamente do que a remoção cirúrgica do tumor (HANSEN; ANDERSON, 2013), o que leva a uma busca contínua pelo desenvolvimento de técnicas não invasivas e não cirúrgicas para o tratamento do câncer de pele (MADAN *et al.*, 2010).

A escolha do tratamento depende de vários fatores, como a natureza clínico-histológica, tamanho e local da lesão, se o tumor é primário ou **reincidente**, disponibilidades e o custo do tratamento (MADAN *et al.*, 2010; HALEM; KARIMKHANI, 2012). Atualmente não existe um padrão ideal para o tratamento do câncer de pele, porém, a cirurgia é defendida em muitos lugares do mundo como primeira opção no procedimento para tratar as lesões cancerígenas na pele (HAMDOON *et al.*, 2011) e muitos estudos têm sido realizados para encontrar novos tratamentos eficazes (CALIN; PARASCA, 2006).

Durante os últimos anos, a TFD tem sido muito estudada clinicamente como uma modalidade de tratamento local para diversas doenças cutâneas, incluindo o câncer de pele do tipo não melanoma (LOPEZ *et al.*, 2004). É um tratamento alternativo, minimamente invasivo que envolve a ativação de um fármaco fotossensibilizador, fonte de luz e a geração de espécies reativas de oxigênio e radicais livres para causar a destruição seletiva do tecido-alvo (ZEITOUNI *et al.*, 2003; BUGGIANI *et al.*, 2008; HAMDOON *et al.*, 2011). O acúmulo do fármaco e o controle na administração da luz no local da lesão fornecem vantagens da TFD em relação aos principais tratamentos de tumores malignos, tais como a proteção de estruturas funcionais, excelentes resultados estéticos, segurança nas repetições do tratamento e menos efeitos colaterais (JIANG *et al.*, 2013), além da possibilidade de aplicação diversas vezes no mesmo local e também da utilização em terapia combinada com os tratamentos tradicionais (HOPPER, 2000; IKEDA *et al.*, 2013).

2.2- TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

A TFD foi inicialmente relatada em 1900, quando Oscar Raab descobriu que a iluminação de culturas microbianas na presença de acridina resultou em morte celular (KESSEL *et al.*, 2006) e com isso, von Tappeiner observou que a toxicidade *in vitro* ocorria como resultado da fluorescência causada pela transferência de energia da luz para o composto químico (MITTON; ACKROYD, 2008). Em 1903, esta descoberta levou à primeira aplicação clínica

da terapia fotodinâmica por Von Tappeiner em cooperação com um dermatologista, utilizando eosina e luz para tratar doenças como lúpus, sífilis, psoríase e câncer de pele superficial (LEE; BARON, 2011). Então, desde 1900, a TFD e todos os seus aspectos, como o mecanismo de ação a partir de diferentes fotossensibilizadores, e aplicações clínicas têm sido bastante estudados.

A terapia consiste na administração e acúmulo do fármaco fotossensibilizador no tecido-alvo, seguido da exposição a uma fonte de luz (MACCORMACK, 2006). Mais especificamente, é uma modalidade de tratamento seletivo para destruição local de células cancerígenas (JOSEFSEN; BOYLE, 2008). Após a administração tópica ou sistêmica do fármaco, que se acumula seletivamente no tumor, é realizada a irradiação por uma fonte de luz no comprimento de onda específico para cada fotossensibilizador, promovendo a sua ativação (Figura 2) (TAPAJÓS *et al.*, 2008; YANO *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2013).

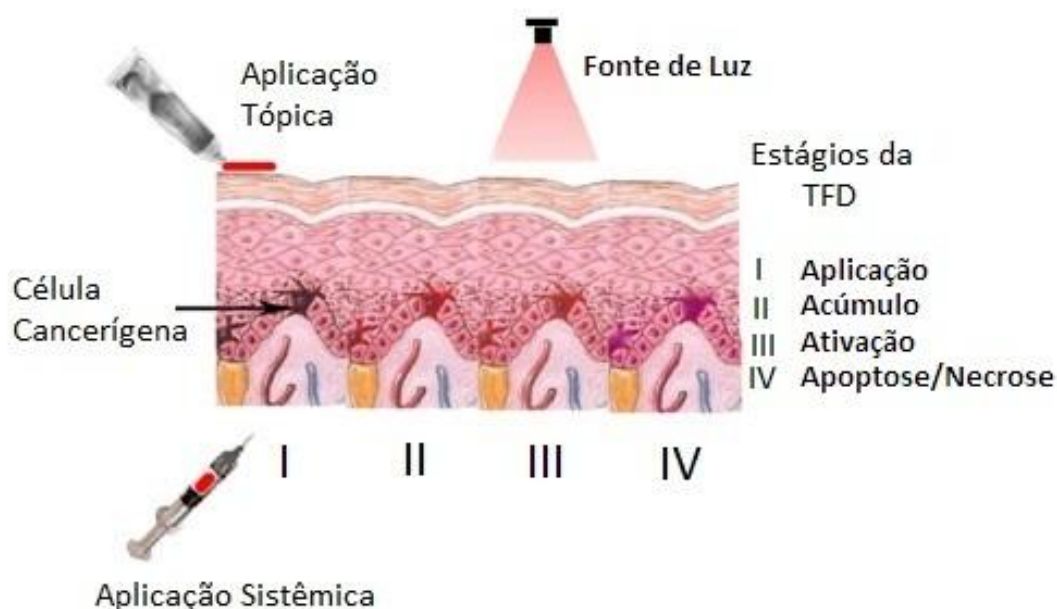


Figura 2: Principais estágios da Terapia Fotodinâmica (CHATTERJEE *et al.*, 2008)

Como o fármaco antes da exposição à luz permanece inativo, somente a área irradiada será tratada, já que não há o acúmulo do fotossensibilizador em

tecidos normais (KONDO *et al.*, 2007; VITTAR *et al.*, 2008). O fármaco pode perder o excesso de energia obtido na sua fotoativação, através da liberação de luz visível, a fluorescência, que também tem importância clínica na dosimetria e na localização exata do tumor (ALLISON; MOGHISSI, 2013).

Há algumas hipóteses formuladas para explicar o acúmulo seletivo dos fármacos fotossensibilizadores em células cancerígenas. Uma delas é que por alguns desses fármacos serem hidrofóbicos, o transporte pela corrente sanguínea (no caso de administração sistêmica) é feito por lipoproteínas como a lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* - LDL). Como nas células neoplásicas a quantidade de receptores para LDL é superior às células normais, há o acúmulo seletivo desses fármacos na lesão (BOZZINI *et al.*, 2012). Outra hipótese é que em pH fisiológico os fotossensibilizadores estão na forma aniônica. E quando entram em contato com o tecido neoplásico, onde o pH é mais ácido, se tornam neutros, aumentando a lipofilicidade e tendo uma melhor absorção neste local (BOZZINI *et al.*, 2012)

Para que ocorra a morte das células neoplásicas por necrose e/ou apoptose, dois principais tipos de reação fotoquímica ocorrem. Na reação tipo I, o fármaco absorve a radiação, passa do estado fundamental para o estado triplete, que participa de reações de óxido-redução com moléculas vizinhas, produzindo radicais livres que reagem com oxigênio presente no local da lesão, para gerar as espécies reativas de oxigênio (EROs) (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; MOOR, 2000; PIETTE *et al.*, 2003; YANO *et al.*, 2011). Na reação fotoquímica tipo II, o fotossensibilizador no estado triplete pode transferir energia para o oxigênio molecular formando oxigênio singlete, uma forma altamente reativa do oxigênio que reage com muitas moléculas biológicas como lipídios e proteínas (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; MOOR, 2000; PIETTE *et al.*, 2003; JOSEFSEN; BOYLE, 2008; YANO *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2013; ALLISON; MOGHISSI, 2013), e assim, o efeito fototóxico da terapia, ocorre apenas na região onde há o acúmulo do fármaco fotossensibilizador e não resulta em efeitos adversos nas células normais, onde não há a presença deste fármaco (KESSEL *et al.*, 2006). Tanto a reação tipo I

quanto a tipo II podem causar danos em componentes celulares e consequentemente a morte das células cancerígenas (MOOR, 2000). O efeito fotodinâmico direto é mediado de acordo com a reação tipo II, pela geração de oxigênio singlete, e assim grande parte da massa tumoral é destruída. Nas células que não foram diretamente afetadas, efeitos secundários podem surgir, tais como: efeitos vasculares, início de apoptose, inflamação e início de uma resposta imune (Figura 3) (CALIN; PARASCA, 2006).

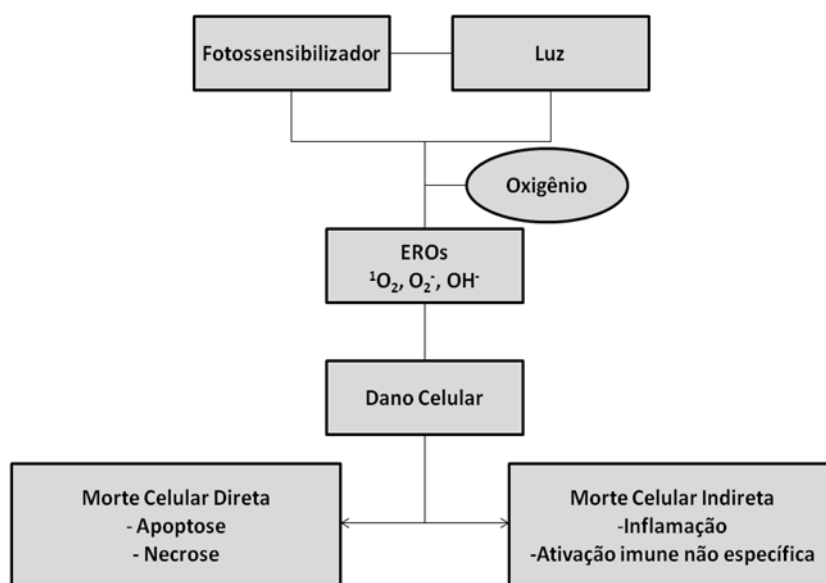


Figura 3: Representação esquemática dos importantes fatores para morte celular mediada pela Terapia Fotodinâmica. (PIETTE *et al.*, 2003).

A eficácia desta terapia depende de fatores como o fotossensibilizador utilizado e sua habilidade de penetrar seletivamente na lesão, o tempo para a ativação do fármaco pela luz, forma farmacêutica para veiculação do fármaco, o nível de oxigenação do tecido e o tipo de célula envolvida na lesão (KONAN *et al.*, 2002; MACCORMACK, 2006).

2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

O desenvolvimento de fotossensibilizadores desempenha um papel fundamental na TFD e com isso se tornou um importante campo de pesquisa nas ciências química e farmacêutica (JIANG *et al.*, 2013). Para um fotossensibilizador ser considerado ideal precisa ser um composto

quimicamente puro e estável, ter baixa solubilidade, ter alta capacidade de geração de EROs, seletividade tumoral sem causar danos às células normais, rápida eliminação, fluorescência, não ser tóxico na ausência de luz e ter picos de absorção em longos comprimentos de onda (600-800 nm) para permitir uma absorção tecidual adequada (NYMAN; HYNNIEN, 2004; TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006; MACCORMACK, 2006; YANO *et al.*, 2011; PASZKO *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2013).

Originalmente, os corantes, a eosina como aplicações e outras substâncias foram empregados e bons resultados foram obtidos. Em pouco tempo, o efeito fotossensibilizador da clorofila e de outras substâncias extraídas de plantas foi relatado, mas o resultado mais interessante de todos foi o descobrimento das porfirinas como agentes fotossensibilizadores (ALLISON *et al.*, 2004). As primeiras aplicações de fotossensibilizadores na TFD foram baseadas na mistura de porfirinas a partir da acidificação da hematoporfirina (os chamados derivados da hematoporfirina) que são a primeira geração de fotossensibilizadores (KÜBLER, 2005; SELMAN, 2007).

O primeiro medicamento aprovado por diversas agências para uso na TFD foi um oligômero da porfirina, o Photofrin® - Axcam Farma (Figura 4) (PIETTE *et al.*, 2003; ALLISON *et al.*, 2004; MACCORMACK, 2006; BOZZINI *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2013), que é ainda o fotossensibilizador mais amplamente utilizado na clínica da TFD (DOUGHERTY *et al.*, 1998; ALLISON; MOGHISSI, 2013). A utilização deste medicamento com a irradiação de luz via fibra óptica ligada a um emissor de laser em 630 nm foi o primeiro sistema aprovado pela FDA (MANG, 2004).

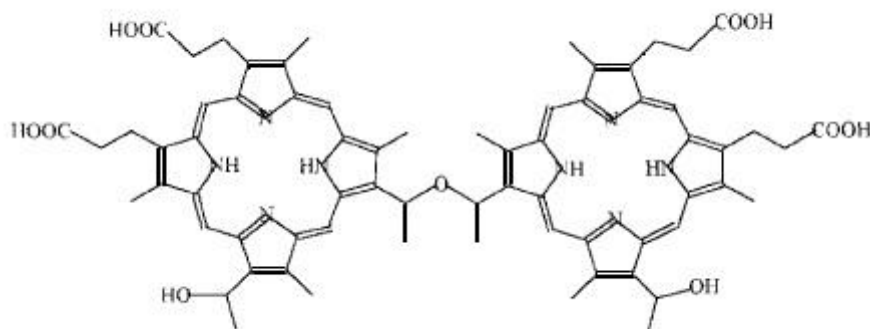


Figura 4: Estrutura do fotossensibilizador Photofrin® na forma de éter.

O Photofrin® é ativado em 630 nm, comprimento de onda que pode promover uma penetração tecidual profunda (PIETTE *et al.*, 2003), porém, nesse comprimento de onda é um agente que não apresenta uma produção ideal de oxigênio singlete, pois possui uma baixa absorção de energia (TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006; IKEDA *et al.*, 2013). Assim, se torna ineficiente contra tumores profundos, mas, efetivo no tratamento de lesões superficiais (IKEDA *et al.*, 2013), além de necessitar de um longo tempo para que a pele se torne fotossensível o que torna o tratamento relativamente longo (Allison *et al.*, 2004; TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006; ALLISON; SIBATA, 2010). Os derivados da hematoporfirina têm outros comprimentos de onda onde são mais ativos, 408 e 510 nm (ALLISON; SIBATA, 2010), porém, mais baixos que o ideal para promover uma eficiente penetração tecidual (PIETTE *et al.*, 2003).

Apesar das desvantagens relacionadas aos derivados da hematoporfirina, o Photofrin® não deixou de ser utilizado na terapia contra o câncer (SHARMAN *et al.*, 1999). Porém, surgiu a necessidade do desenvolvimento de uma nova geração de fotossensibilizadores (JIANG *et al.*, 2013), que tinha como objetivo superar as desvantagens dos primeiros fármacos sendo fundamental para que a TFD se desenvolvesse no tratamento contra o câncer (JOSEFSEN; BOYLE, 2008; ALLISON; SIBATA, 2010).

Os fotossensibilizadores de segunda geração possuem um menor período para fotossensibilização, forte banda de absorção na região do vermelho, ou seja, longos comprimentos de onda para sua ativação e dessa

maneira possuem um melhor efeito de penetração na pele e maior eficiência na produção de oxigênio singlete, além de melhor seletividade tumoral (HOPPER, 2000; NYMAN; HYNNIEN, 2004). Nos grupos que são mais ativamente estudados estão as porfirinas, os derivados da clorofila, as clorinas e as ftalocianinas (HOPPER, 2000; ALLISON; SIBATA, 2010).

Um notável agente da segunda geração de fotossensibilizadores é o ácido 5-aminolevulínico (ALA) como precursor metabólico da protoporfirina IX (PPIX) (Figura 5). É um aminoácido endógeno, biossintetizado nas mitocôndrias tanto de animais quanto de plantas. O ALA é um composto hidrofílico e pode ser formulado para administração tópica, sistêmica e oral (ALLISON *et al.*, 2005; ISHIZUKA *et al.*, 2011). O método de acúmulo seletivo de PPIX no tumor não é claro, mas a presença na epiderme e estrato córneo (EC) anormais permite a absorção do fotossensibilizador mais facilmente (IBBOTSON, 2010).

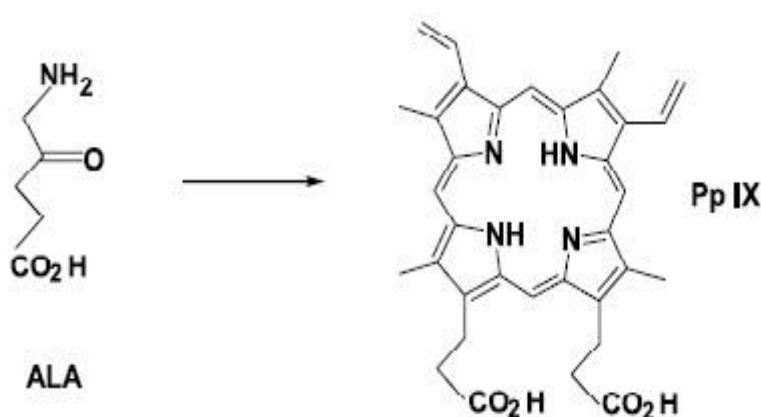


Figura 5: Esquema do ácido 5-aminolevulínico (ALA) como precursor da protoporfirina IX (PPIX) (SIMPLICIO *et al.*, 2002).

O princípio da TFD com ALA é que este precursor em excesso resulta no acúmulo de porfirinas intracelulares, especialmente PPIX, nas células cancerígenas (SOLER *et al.*, 2001; KESSEL *et al.*, 2006; BOZZINI *et al.*, 2013), que absorve luz na região do visível, com picos de absorção em diversos comprimentos de onda, tendo o pico máximo de absorção em 630 nm (ROSE; STABLES, 2008; SHAFIRSTEIN *et al.*, 2011). A aplicação tópica de ALA é um

procedimento não-invasivo, tem um curto período para a fotossensibilização, permite o tratamento de lesões múltiplas e tem um bom resultado estético após o tratamento (SIERÓN *et al.*, 2004). O ALA atualmente está disponível como uma solução tópica 20%, o Levulan® (Dusa Pharmaceuticals), e se tornou o fotossensibilizador mais frequentemente usado para doenças dermatológicas nos Estados Unidos (MACCORMACK, 2006), indicado principalmente para queratose actínica, uma lesão pré-cancerosa (MORTON *et al.*, 2008).

O ALA é um composto hidrofílico e devido a essa propriedade físico-química, tem uma baixa distribuição tecidual, e então os ésteres do ALA, como o metil 5-aminolevulínico (MAL) que têm maior lipofilicidade, resultam numa penetração cutânea mais efetiva (ZENZEN; ZANKL, 2004; LEE; BARON, 2011). O MAL encontra-se disponível comercialmente como Metvix® (Photocure ASA) para queratose actínica, doença de Bowen (carcinoma espinocelular) e carcinoma basocelular nodular e superficial (MORTON *et al.*, 2008).

Após a administração de ALA ou MAL, é necessário um período para que haja a produção e o acúmulo de PPIX antes da ativação pela luz. Protocolos clínicos para a TFD se baseiam no pressuposto de que o intervalo ótimo entre a administração do fotossensibilizador e a iluminação, é no momento em que há a máxima diferença entre a retenção do fármaco no tumor e no tecido normal circundante (CRAMERS *et al.*, 2003). Para o tratamento da queratose com ALA, monografias canadenses e americanas, estipulam um tempo de 14 a 18 horas sob oclusão. E para o tratamento tanto do carcinoma basocelular como pra queratose actínica, o MAL necessita de 3 horas sob oclusão (SHARMAN *et al.*, 1999; BRAATHEN *et al.*, 2007; ALLISON; SIBATA, 2010).

Além do Photofrin®, Levulan® e Metvix®, o Foscan® - Biolitec Pharma Ltda – também já foi aprovado como paliativo do câncer avançado de cabeça e pescoço (MARCHAL *et al.*, 2007; CAMERIN *et al.*, 2010). O Foscan é uma clorina (meta-tetrahidroxifenilclorina), fotossensibilizador de segunda geração aprovado para utilização na TFD na Europa (MARCHAL *et al.*, 2007). É um

composto químico puro com um forte pico de absorção em 652 nm e é um dos fotossensibilizadores mais potentes para uso clínico, porém, o intervalo entre a administração do fármaco e a irradiação é geralmente de quatro dias, período relativamente alto para que se inicie a terapia (CRAMERS *et al.*, 2003).

Outro fotossensibilizador de segunda geração é a hipericina, estudado como um potente fármaco para uso dermatológico na TFD (BOIY *et al.*, 2010; ROOK *et al.*, 2010). É um corante derivado da planta *Hypericum perforatum* (erva de São João), que historicamente tem sido utilizada para fins medicinais (KUBIN *et al.*, 2005; BOIY *et al.*, 2010). A hipericina possui propriedades adequadas para a utilização na TFD e tem demonstrado atividade fotocitotóxica tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SMELÁKOVÁ *et al.*, 2012). Ainda não se encontra disponível comercialmente e tem sido amplamente estudada experimentalmente *in vitro* e *in vivo* na aplicação da TFD.

Novas abordagens estão sendo investigadas a fim de superar as limitações atuais da TFD, incluindo o desenvolvimento de fotossensibilizadores de segunda geração com propriedades fotoquímicas e seletividade tumoral melhoradas (CAMERIN *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2013). Um segundo grupo estrutural de fotossensibilizadores amplamente estudado é o das Ftalocianinas, e em menor proporção as Naftalocianinas (CASTANO *et al.*, 2004).

2.4- FTALOCIANINAS

As ftalocianinas e seus derivados são fotossensibilizadores de segunda geração, compostos quimicamente puros que absorvem luz em comprimentos de onda mais longos que outros fármacos com picos de absorção aproximadamente em 680nm (TAPAJÓS *et al.*, 2008). A eficiente geração de oxigênio singlete, alta termoestabilidade, características espectroscópicas desejáveis e baixa toxicidade no escuro são propriedades que contribuem para que as ftalocianinas, atualmente, sejam um dos fotossensibilizadores mais potentes e promissores (GOLINSKI *et al.*, 2011).

As ftalocianinas têm fortes picos de absorbância em comprimentos de onda mais longos que os das porfirinas (670-680 nm) o que tende a melhorar

as propriedades fotoquímicas e fotofísicas e a aumentar a penetração tecidual (KOLAROVA *et al.*, 2007; LONGO *et al.*, 2009; ALLISON; SIBATA, 2010). A molécula da ftalocianina é uma estrutura composta por quatro unidades de benzopirrol ligadas a quatro átomos de nitrogênio.

Sua estrutura química contém uma variedade de íons metálicos que são responsáveis pelas propriedades inerentes a cada fotossensibilizador (Figura 6) (TAPAJÓS *et al.*, 2008). Dessa maneira, as propriedades físico-químicas das ftalocianinas podem ser ajustadas alterando o íon metal central e também os substituintes na periferia dos anéis benzênicos, o que modifica as propriedades eletrônicas do composto (LIU *et al.*, 2007; YANIK *et al.*, 2009; ZHONG *et al.*, 2010; LOKESH; ADRIAENS, 2013). Outra vantagem das ftalocianinas é que elas podem se acumular seletivamente além de ter uma eficiente eliminação dos tecidos-alvo, observada pela pouca fluorescência 24h após a administração do fármaco (LONGO *et al.*, 2009).

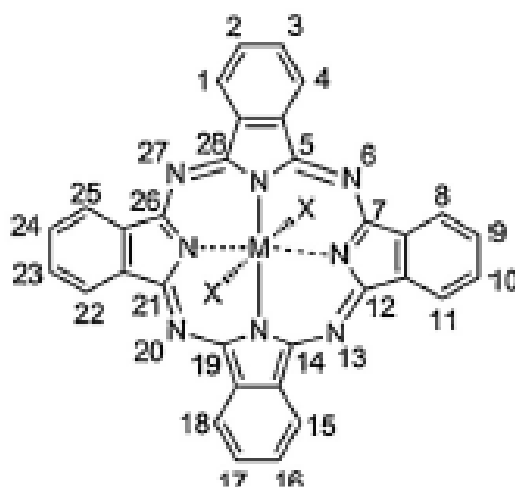


Figura 6: Estrutura molecular plana das ftalocianinas metálicas.

A inclusão de grupos sulfonados torna as ftalocianinas solúveis em água e pode afetar a captação celular. Os compostos menos sulfonados e não sulfonados são mais lipofílicos, e mostram melhores propriedades de penetração nas membranas celulares e mais alta atividade biológica (KOLAROVA *et al.*, 2007). Nos últimos anos um grande número de ftalocianinas tem sido avaliado por possuírem atividade fotodinâmica,

principalmente as ftalocianinas de silicone, zinco e alumínio, por apresentarem propriedades fotofísicas desejáveis (YANIK *et al.*, 2009). Atualmente, apenas a Rússia aprovou a utilização de uma ftalocianina na TFD, comercialmente disponível como Photosens®. Sua formulação é uma solução de sais de alumínio ftalocianina sulfonada (Figura 7) e é altamente efetivo no tratamento de vários tipos de câncer (ALLISON; SIBATA, 2010; JIANG *et al.*, 2013). Outras três formulações estão em fase de ensaios clínicos nos Estados Unidos, Suíça e China (JIANG *et al.*, 2013).

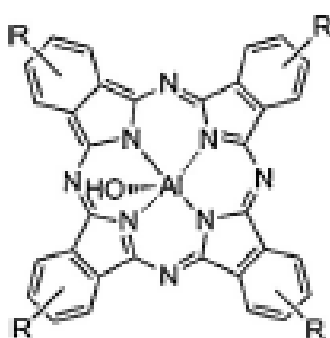


Figura 7: Estrutura molecular plana do Photosens®.

As ftalocianinas metálicas contêm um íon metal central tetra coordenado que no caso do íon trivalente alumínio, o excesso de elétrons é usado na formação de ligações químicas, com o Cloro, para fora do plano estrutural (Figura 8) (PALEWSKA *et al.*, 2012). O Cloro ligado ao átomo de alumínio central oferece uma grande possibilidade de aplicações devido as suas propriedades fotossensibilizantes (KARÁSKOVÁ *et al.*, 2012), além de apresentar as propriedades fotofísicas mais favoráveis para a aplicação da TFD (SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2010). A Alumínio-Cloro Ftalocianina (AlClPc), como a maioria dos fotossensibilizadores desta classe, é uma molécula hidrofóbica e pode facilmente agregar em meio aquoso devido a fortes interações entre as suas moléculas (CHEN *et al.*, 2009; USLAN *et al.*, 2012), alterando suas propriedades fotofísicas, como a produção de oxigênio singlete, e propriedades químicas, como a diminuição da solubilidade (BECHET *et al.*, 2008). Com a forte agregação das moléculas deste fármaco, há a formação de

2.5- NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS (NL)

As NL têm sido amplamente estudadas como sistemas para a liberação de fármacos (MARTINS *et al.*, 2012). As partículas são de tamanho nanométrico (50-1000 nm) e são compostas de lipídios fisiologicamente tolerados pelo corpo humano (biocompatível e biodegradável) e sólidos tanto em temperatura ambiente quanto corporal (ZUR MÜHLEN *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 2008; JOSHI; PATRAVALE, 2008; DONG *et al.*, 2012). Esses sistemas possuem boa estabilidade física, possibilitam a veiculação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos, promovem a liberação controlada e proteção do fármaco contra degradação oxidativa, fotoquímica e química, possibilitam a produção em larga escala, são biocompatíveis e biodegradáveis, tornando esses sistemas menos tóxicos comparados a outros carreadores (MEI *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013). Existem dois tipos de NL: as Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os complexos lipídicos nanoestruturados (CLN) (DAS *et al.*, 2011b).

As NLS foram desenvolvidas no início dos anos 90 como uma alternativa a sistemas de liberação como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (MÜLLER *et al.*, 1995; HOU *et al.*, 2003; PARDEIKE *et al.*, 2009). Combinam as vantagens desses sistemas e ao mesmo tempo evitam ou minimizam as suas desvantagens (WISSING *et al.*, 2004; HUO; ZHOU, 2007; MARTINS *et al.*, 2012).

NLS oferecem um atrativo sistema para liberação de fármacos, particularmente para fármacos hidrofóbicos (SUBED *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012). São derivadas das emulsões o/a, porém substituindo o lipídio líquido (óleo) por um lipídio sólido (MÜLLER *et al.*, 2007) (Figura 9). Esses lipídios possuem alto ponto de fusão formando um núcleo sólido revestido por moléculas de tensoativos (PRIYANKA; ABDUL, 2012; KHURANA *et al.*, 2013). A substituição do lipídio líquido das emulsões por lipídio sólido é muito interessante para que uma liberação controlada de fármacos seja alcançada, devido a menor mobilidade do fármaco na matriz lipídica sólida quando comparado ao lipídio líquido (MEHNERT; MÄDER, 2012). Para facilitar a

aplicação tópica, as dispersões lipídicas fluidas, que são obtidas com baixas quantidades de fase lipídica, podem ser incorporadas em uma base em creme ou gel desde que não induzam a dissolução ou agregação das partículas (SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007).

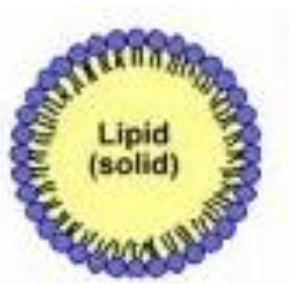


Figura 9: Representação de uma nanopartícula lipídica sólida.

Algumas desvantagens estão associadas às NLS, tais como eficiência de encapsulação limitada devido à estrutura cristalina do lipídio sólido, transição polimórfica levando a uma possível expulsão do fármaco, mudança no perfil de liberação durante o tempo de armazenamento e aumento do tamanho da partícula (DAS; CHAUDHURY, 2011a; DONG *et al.*, 2012).

A cristalização do lipídio é um importante fator no desenvolvimento dos sistemas lipídicos, pois afeta diretamente nas propriedades de liberação e na expulsão do fármaco das NLS durante o armazenamento (MEHNERT; MÄDER, 2001; LIU; WU, 2010). Essa expulsão ocorre porque as moléculas do fármaco geralmente ficam alojadas entre as cadeias dos ácidos graxos ou como aglomerados amorfos nas imperfeições dos cristais, dentro da matriz sólida. Porém, se houver uma transição polimórfica, ou seja, quando a estrutura tende a formar uma cadeia cristalina mais organizada, há modificações na matriz lipídica, resultando em uma estrutura com espaços muito pequenos para as moléculas do fármaco, o que leva a sua expulsão e/ou a formação de cristais, se as partículas estiverem em dispersão aquosa (MÜLLER *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2012).

Para reduzir as limitações das NLS, os CLN foram desenvolvidos como sistemas carreadores alternativos (DAS *et al.*, 2012). Os CLN são uma nova geração das NL (PARDEIKE *et al.*, 2009; AGRAWAL *et al.*, 2010) e são obtidos pela mistura de lipídios sólidos e lipídios líquidos (PARDEIKE *et al.*, 2009; DOKTOROVÁ *et al.*, 2010), porém as partículas permanecem no estado sólido devido ao controle da quantidade do lipídio líquido (LIU; WU, 2010).

Problemas associados às NLS como a capacidade limitada para veiculação de fármacos pode ser melhorada porque a mistura de lipídios cria uma estrutura cristalina desorganizada com muitas imperfeições gerando mais espaços para acomodação do fármaco (DOKTOROVÁ *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011). Outras limitações que podem ser superadas ou minimizadas com os CLN são o controle na liberação e a expulsão do fármaco durante armazenamento (FANG *et al.*, 2008).

Em geral, para a obtenção das NLS utiliza-se lipídio (s) sólido (s), tensoativo (s) e água. O processo básico para a obtenção desse sistema consiste na fusão do lipídio sólido ou da mistura de lipídios, solubilização do fármaco nesta fase lipídica e subsequente dispersão em uma solução aquosa de tensoativo, formando uma pré-emulsão a quente. Com o resfriamento da emulsão as gotículas lipídicas cristalizam formando as nanopartículas lipídicas com a matriz sólida (MÜLLER *et al.*, 2007). Para a obtenção de CLN, apenas adiciona-se uma porcentagem de lipídio líquido ao lipídio sólido ou mistura de lipídios sólidos. Os lipídios utilizados nesses sistemas incluem triglicerídeos, glicerídeos parciais, ácidos graxos, esteroides e ceras. Todos os tipos de tensoativos, no que diz respeito a sua carga e peso molecular, podem ser utilizados para a estabilização da dispersão lipídica (MEHNERT; MÄDER, 2012). Dependendo da composição da matriz lipídica, diferentes perfis de liberação podem ser obtidos incluindo liberação prolongada ou controlada do fármaco, o que diminui o risco da liberação rápida de altas concentrações do fármaco, comumente relatado com o uso de sistemas convencionais (GUPTA; VYAS, 2012). Baixas concentrações de tensoativos durante o processo de cristalização pode ocasionar agregação das partículas e a desestabilização do

sistema (HELGASON *et al.*, 2009), o que não garantiria a formação de sistemas promissores para veiculação de fármacos tanto para administração sistêmica quanto para aplicação tópica.

O tratamento tópico de doenças tem adquirido relevância no meio científico, devido ao menor risco de efeitos colaterais sistêmicos e uma melhoria na adesão do paciente ao tratamento quando comparado à administração oral ou parenteral de medicamentos (SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007; PUGLIA *et al.*, 2008; KÜCHLER *et al.*, 2009). No entanto, o EC, principal barreira da pele, impede a penetração de xenobióticos na epiderme viável, e apenas uma pequena porcentagem do medicamento aplicado é absorvida (SCHÄFER-KORTING *et al.*, 2007; KÜCHLER *et al.*, 2009).

Como sistemas de liberação tópica, as NL podem melhorar a solubilidade aparente do fármaco encapsulado, o que leva ao aumento do seu gradiente de concentração na pele, facilitando a permeação (HAN *et al.*, 2012). Como são formados por lipídios não irritantes e não tóxicos podem ser utilizados na pele danificada e/ou inflamada (LV *et al.*, 2009). Devido à matriz sólida desses carreadores, é possível obter um controle na liberação do fármaco, uma ferramenta muito importante quando é necessário o fornecimento do medicamento por tempo prolongado e para fármacos que são irritantes em altas concentrações (JENNING *et al.*, 2000; SOUTO *et al.*, 2004; JOSHI; PATRAVALE, 2008).

Com a formação de partículas em tamanho nanométrico, há a garantia de um contato próximo ao EC o que pode aumentar a quantidade de fármaco penetrando na pele ou mucosa (JENNING *et al.*, 2000; SOUTO *et al.*, 2004; JOSHI; PATRAVALE, 2008; PARDEIKE *et al.*, 2009).

As NL possuem ainda propriedades oclusivas, ou seja, após a aplicação da formulação há a formação de um filme lipídico sobre a pele, evitando a perda de água por evaporação, e com isso um efeito hidratante é observado (WISSING; MÜLLER, 2002; WISSING; MÜLLER, 2003; PARDEIKE *et al.*,

2009). Quanto menor o tamanho das partículas e mais alta cristalinidade, maior o efeito oclusivo sobre a pele (KUNTSCHE *et al.*, 2008).

Devido as vantagens acima mencionadas, este trabalho propõe o desenvolvimento de NL para aplicação tópica da AICIPc, um fotossensibilizador de segunda geração, hidrofóbico e potente, porém que tende a agregar em formas farmacêuticas convencionais reduzindo sua eficácia clínica. Assim, a veiculação da AICIPc em NL torna-se uma alternativa promissora para o tratamento do câncer de pele através da TFD.

3. OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e caracterizar Nanopartículas Lipídicas contendo Alumínio-Cloro Ftalocianina para aplicação no tratamento de câncer de pele através da Terapia Fotodinâmica;

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter Nanopartículas Lipídicas Sólidas contendo Alumínio-Cloro Ftalocianina;
- Obter Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com diferentes proporções lipídio sólido/lipídio líquido;
- Caracterizar morfologicamente e físico-quimicamente os sistemas obtidos;
- Determinar a Eficiência de Encapsulação e Teor da AIClPc nos sistemas;
- Avaliar a penetração cutânea *in vitro* da AIClPc utilizando células de difusão tipo Franz;
- Avaliar a penetração cutânea *in vivo* da AIClPc utilizando camundongos hairless através de microscopia de fluorescência;

4. MATERIAL

O fotossensibilizador AICIPc utilizado neste trabalho foi adquirido da Sigma-Aldrich, o Ácido Esteárico e o Lauril Sulfato de Sódio da Vetec; o Ácido Oléico, o Cloreto de Cetilpiridíneo, o Dimetil Sulfóxido foram adquiridos da Synth e o Álcool Etílico Absoluto e o Polietileno Glicol 300 adquiridos na Neon. Todos os outros solventes e reagentes utilizados foram de grau analítico.

5. METODOLOGIA

5.1- PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO AICIPc

As dispersões de NLS e CLN foram preparadas pelo método de difusão de solvente em fase aquosa, descrito por HU *et al.*, 2002, utilizando o Ácido Esteárico (AE) como lipídio sólido para as NLS e Ácido Oléico (AO) incorporado na matriz sólida em diferentes proporções para os CLN (Tabela 1). A fase lipídica foi fundida a 70°C em banho-maria, em seguida a fase orgânica composta da AICIPc dispersa em etanol foi vertida na fase lipídica. Esta fase orgânica resultante foi então dispersa numa solução aquosa de Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 2% e mantida sob agitação magnética constante de 600 rpm por 24 horas, a temperatura ambiente. Após a evaporação do solvente, a dispersão lipídica é formada por precipitação do lipídio em um meio aquoso (MEHNERT; MÄDER, 2012).

A Tabela 1 apresenta a composição final das dispersões lipídicas desenvolvidas no estudo. Para a obtenção destes sistemas na forma sólida, as amostras foram resfriadas para que houvesse a precipitação das nanopartículas, e então foram submetidas à centrifugação a 5000 rpm por 1 hora a 4°C. O sobrenadante retirado e as nanopartículas sedimentadas foram dispersas numa solução aquosa de SDS 0,2% e centrifugadas novamente por 30 minutos, para solubilização do fármaco adsorvido na superfície das NL. O sedimento das nanopartículas foi congelado e posteriormente liofilizado. Os dois sobrenadantes foram utilizados para a quantificação da Eficiência de Encapsulação (EE) e Teor (seção 4.2.3).

Tabela 1: Composição das Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados desenvolvidos

Amostra	AE (%)	AO (%)	AICIPc (mg)	SDS (%)	Etanol (mL)	Água q.s (mL)
NLS Inerte	100	-	-	2	3	120
NLS-AICIPc	100	-	5	2	3	120
CLN 20	80	20	5	2	3	120
CLN 40	60	40	5	2	3	120

NLS Inerte: Nanopartícula Lipídica sem o fármaco; NLS-AICIPc: Nanopartícula contendo o fármaco; CLN 20: Carreadores Lipídicos Nanoestruturados contendo 20% de Ácido Oléico; CLN 40: Carreadores Lipídicos Nanoestruturados contendo 40% de Ácido Oléico.

5.2- CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS SISTEMAS OBTIDOS

5.2.1- TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

A caracterização por tamanho de partícula e índice de polidispersividade (IPD) foi realizada pelo método de espalhamento de luz dinâmico e a medida do Potencial Zeta foi realizada pela técnica de microeletroforese, ambas utilizando um Zetasizer (Malvern Instruments, UK), no Departamento de Física da Universidade de Sergipe.

5.2.2- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A MET foi realizada para caracterização morfológica das NLS, utilizando um microscópio FEI, Morgagni 268D no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Inicialmente, as dispersões foram centrifugadas e concentradas antes das análises. Em seguida, 10 µL das dispersões lipídicas concentradas foram aplicadas sobre uma grade de cobre revestida com filme de carbono. O excesso da dispersão foi removido com papel absorvente. Em seguida, foi

adicionado 10 µL de ácido fosfotúngstico (PTA) 2% como agente de contraste, e deixado em repouso por 5 minutos. 10µL de água foi adicionado, duas vezes, para lavagem da formulação e o excesso removido com papel absorvente. As grades de cobre foram então secas em dessecador, fixadas no suporte de amostras e em seguida as amostras foram examinadas utilizando MET.

5.2.3- DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E TEOR

A EE foi obtida pelo método indireto (HU *et al.*, 2008), através da quantificação por espectrofluorimetria do fármaco não encapsulado nos sobrenadantes removidos na etapa de obtenção das nanopartículas. O método para quantificação foi previamente validado segundo ALMEIDA *et al.*, 2012, onde a linearidade foi alcançada entre as concentrações de 0,01 e 0,2µg/mL apresentando coeficiente de correlação linear (R) de 0,998. Parâmetros tais como precisão, exatidão e limite de quantificação também foram avaliados e considerados adequados para um método analítico de quantificação.

Par calcular a EE e teor foram realizados foram utilizadas as equações 1 e 2, respectivamente.

Eq (1): Determinação da Eficiência de Encapsulação

$$EE(\%) = \frac{(QT - QS1 - QS2) \times 100}{QT}$$

Eq (2): Determinação do teor

$$Teor(\%) = \frac{(QT - QS1 - QS2) \times 100}{QT - QS1 - QS2 - QL}$$

Onde,

QT: Quantidade total de AICIPc adicionada à formulação;

QS1: Quantidade presente no sobrenadante após a primeira centrifugação;

QS2: Quantidade presente no sobrenadante após a segunda centrifugação;

QL: Quantidade total de lipídio sólido.

5.3- ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica através da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é amplamente utilizada para caracterizar o grau de cristalinidade e a transição polimórfica de lipídios (MENDES *et al.*, 2013), já que diferentes modificações e composições lipídicas apresentam mudanças de entalpias e picos de fusão (SWATHI *et al.*, 2010).

Curvas DSC do AE, das NLS inertes e das NL contendo AIClPc foram obtidas utilizando instrumento DSC TA Instruments modelo Q20, sob fluxo de argônio (50 mL/min), razão de aquecimento de 10°C/min, faixa de temperatura entre 25-250°C.

As curvas de DSC também permitem determinações quantitativas, já que a área dos picos de fusão está relacionada com a energia envolvida no processo, ou seja, a entalpia de fusão (BERNAL *et al.*, 2002). O índice de recristalização (IR) do AE e das formulações foi calculado usando a equação 3 (TIWARI;PATHAK, 2011; MANEA *et al.*, 2013):

Eq (3): Índice de Recristalização

$$IR(\%) = \frac{\Delta H_{NL \text{ liofilizada}} [J \cdot g^{-1}] \times 100}{\Delta H_{AE} [J \cdot g^{-1}] \times C_{\text{fase lipídica}}}$$

Onde, $\Delta H_{NL \text{ liofilizada}}$ é a entalpia de fusão das NL;

ΔH_{AE} é a entalpia de fusão do AE;

$C_{\text{fase lipídica}}$ é a Concentração da fase lipídica (m/v), dada pela porcentagem do lipídio sólido na dispersão lipídica final.

5.4- ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

Para avaliar o grau de cristalinidade das amostras de nanopartículas lipídicas, medidas de SAXS foram realizadas na estação de medidas D11-A SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, o qual é equipado com um monocromador ($\lambda = 1,608 \text{ \AA}$), uma câmara de ionização, um detector vertical e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento. O espalhamento das partículas existentes no sistema será subtraído da intensidade total da amostra. As intensidades de todas as amostras serão medidas em unidades relativas, mas para uma comparação quantitativa, as medidas foram normalizadas nas mesmas condições experimentais. Um detector de raios-X vertical e um analisador multicanal foram utilizados para registrar a intensidade do espalhamento, $I(Q)$, como uma função do módulo do espalhamento do vetor q (Formariz, 2007). O valor de “ q ” pode ser convertido para a distância entre os locais de espalhamento aplicando a Lei de Bragg de acordo com a Equação 4 (CASTRO et al., 2009).

Eq (4): Lei de Bragg

$$q_n = \frac{2n\pi}{d}$$

Onde, q_n = é a posição do pico de difração de ordem n

d = distância entre os locais de espalhamento

5.4- AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTROLE

Devido à forte tendência de agregação da AICIPc, foram obtidos espectros de absorção na região ultravioleta e visível (UV-vis) da ftalocianina em diversos solventes: DMSO, Etanol, Polietilenoglicol 300 (PEG 300), para avaliar o comportamento de absorção do fármaco. Varreduras na faixa de 200-800nm foram realizadas utilizando o espectrômetro 800XI - Femto.

5.5- ESTUDO *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO CUTÂNEA

O estudo de penetração cutânea foi realizado a partir de dispersões lipídicas das NL contendo AICIPc e de uma formulação controle, formada por

uma solução de PEG 300 contendo a mesma concentração de AICIPc que as dispersões testadas (41,67 µg/mL). Foram utilizadas peles da região dorsal de orelhas de porco entre os compartimentos doador e receptor das células de Franz. As orelhas foram provenientes de animais recentemente sacrificados em matadouros locais, aonde, a pele foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi, seguindo-se a remoção do tecido gorduroso remanescente na pele utilizando tesoura cirúrgica. O compartimento receptor foi preenchido com Tampão Fosfato 7,2 contendo 1% CCP como tensoativo (ROSSETI *et al.*, 2011), enquanto o compartimento doador foi preenchido com 1 mL de dispersão lipídica contendo 0,4% de natrosol ou formulação controle. Em tempos pré - determinados (2, 4, 8, 10 e 24h), foi coletado 3 mL do compartimento receptor sendo este imediatamente repostado pelo mesmo volume de solução receptora. As células de Franz foram mantidas em agitação constante de 600 rpm a 37°C.

Após 24h de cinética foram realizados os estudos de retenção cutânea, utilizando a técnica de *tape stripping*. Para isso, as peles utilizadas no estudo de permeação *in vitro* foram removidas das células de difusão e lavadas com água destilada, e secas com papel absorvente. As peles foram fixadas com fitas adesivas em uma superfície lisa com o EC voltado para cima, sendo exposta a apenas a área de permeação, ou seja, a área que estava em contato direto com a formulação durante o estudo de permeação. 15 fitas (sendo a primeira eliminada) foram aplicadas sucessivamente sobre a pele para retirada do EC. As fitas foram unidas e colocadas em um tubo de extração com 4 mL de DMSO e agitadas em um mixer por 1 minuto, em seguida, foram submetidas a banho de ultrassom. As soluções foram quantificadas por espectrofluorimetria.

O tecido cutâneo remanescente foi cortado em pequenos pedaços, colocado em um tubo de extração com 4 mL de DMSO, homogeneizado em homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax – T-50) por 1 minuto e posteriormente submetido a ultrassom por 20 minutos. A solução foi filtrada em membrana de poro 0,45 µm e quantificada por espectrofluorimetria.

5.6- ESTUDO *IN VIVO* DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA

A penetração cutânea *in vivo* da AICIPc foi avaliada a partir da aplicação de 200 µL da dispersão da AICIPc veiculada em NLS e CLN e da formulação controle, no dorso de camundongo Hairless (n=3) obtidos do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A formulação foi mantida no dorso do camundongo por 8 horas. A pele do camundongo não tratada foi utilizada como controle da auto-fluorescência da pele. Após 8 horas de aplicação da formulação, a área da pele tratada foi imediatamente removida. As amostras foram incorporadas em meio de congelamento Tissue Tec, congeladas e seções transversais da pele foram cortadas (30 µm) em criostato. Os cortes foram montados em lâminas de vidro sem coloração adicional e a visualização da penetração da AICIPc e observados em microscópio de fluorescência (Axio Imager.A1, Zeiss, Alemanha) utilizando objetiva de 10x filtro Set 50, que possibilita a excitação da AICIPc em comprimentos de onda entre 610 e 670 nm e emissão de fluorescência acima de 650 nm, e tempo de integração de 41 ms.

5.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre as formulações foram analisadas por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey, utilizando o software BioEstat 5.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

Todas as amostras obtidas foram preparadas utilizando o AE como matriz sólida, que tem sido relatado como um adequado material na obtenção de nanopartículas lipídicas (WANG *et al.*, 2012).

A análise de tamanho de partícula foi realizada pela técnica de espectroscopia de correlação de fóton, que mede a variação na intensidade do espalhamento de luz causado pelo movimento das partículas (MEHNERT;

MÄDER; 2012). Através desta técnica foi possível confirmar a obtenção de partículas na faixa nanométrica. Um dos fatores mais importantes responsáveis pela diminuição no tamanho das partículas é a concentração do tensoativo em solução (KUMAR; RANDHAWA, 2013). Em estudos preliminares, foi feita a escolha da concentração de SDS em 2%, através da variação desta e mantendo constantes as concentrações dos outros componentes (dados não mostrados). As principais funções do tensoativo são a estabilização da dispersão lipídica e a prevenção do aumento do tamanho de partícula durante o armazenamento da formulação, como também controlar a cristalização e a transição polimórfica (KUMER; RANDHAWA, 2013), ou seja, as propriedades das partículas sólidas resultantes (LOPEZ *et al.*, 2012).

Normalmente, diversos fatores influenciam no tamanho de partícula, como a concentração e o tipo de lipídio e tensoativo (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2008). NLS e CLN apresentaram tamanho médio na escala nanométrica e observa-se que o tamanho de partícula foi afetado pela incorporação e pelo aumento na concentração AO. O aumento do lipídio líquido de 0% para 20% e para 40% resultou na diminuição do tamanho médio de partícula de 291 nm para 264 nm e 205 nm, respectivamente (Tabela 2). Observações semelhantes foram relatadas por outros autores (AGRAWAL *et al.*, 2010; MARQUELE-OLIVEIRA *et al.*, 2010 e ZHENG *et al.*, 2013). Segundo HU *et al.*, 2005, TIWARI;PATHAK, 2011 e UPRIT *et al.*, 2013, altas quantidades de AO reduzem a viscosidade dentro da matriz lipídica e conseqüentemente reduzem a tensão superficial, auxiliando a formação de nanopartículas distribuídas de maneira homogênea. A incorporação da AICIPc nas NLS resultou no aumento no tamanho médio da partícula de 142 nm para 291nm, o que também foi observado por PROMBUTARA *et al.*, 2012 e MARTINS *et al.*, 2012 quando incorporaram fármacos em NLS.

O potencial zeta é a medida geral das cargas adquiridas pelas partículas em um determinado meio e pode ser considerado uma referência na estabilidade de sistemas coloidais (RAHMAN *et al.*, 2010), pois indica o grau de repulsão entre as partículas na dispersão (DAS *et al.*, 2012). Todas as

dispersões apresentaram, em módulo, altos valores de potencial zeta, com carga negativa, acima de 50 mV. O potencial zeta negativo sugere que o tensoativo, que tem uma porção negativa estabiliza o lipídio por estar adsorvido na superfície da partícula e fornece a estabilidade eletrostática (KUMAR; RANDHAWA, 2013) já que, altos valores de potencial zeta produzem grande repulsão eletrostática entre as partículas, resultando em alta estabilidade física dos sistemas (RIDOLFI *et al.*, 2012, MEHNERT; MÄDER; 2012), pois previne a agregação das partículas (DAS *et al.*, 2012).

Tabela 2: Caracterização por tamanho médio, Índice de Polidispersividade (IPD) e Potencial Zeta das Nanopartículas Lipídicas desenvolvidas

Amostra	Tamanho médio (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
NLS Inerte	142,7 +/- 9,1	0,45 +/- 0,04	-56,1 +/- 17,3
NLS-AICIPc	291,6 +/- 3,6	0,53 +/- 0,05	-57 +/- 15
CLN 20	264,4 +/- 25,2	0,45 +/- 0,06	-54,4 +/- 19,4
CLN 40	205,9 +/- 22,7	0,467 +/- 0,04	-69,1 +/- 18,5

Cada análise foi realizada em triplicata

6.2- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para obter mais informações sobre tamanho de partícula e morfologia, foram realizadas análises de MET da NLS inerte, NLS-AICIPc, CLN 20 e CLN 40. Na Figura 10, observa-se a ausência de agregação das partículas, confirmando as análises de potencial zeta. Variações no tamanho de partícula são esperadas, já que para as análises de MET as nanopartículas são expostas a vácuo elevado dentro de uma coluna de feixe de elétrons, enquanto

que na espectroscopia por correlação de fóton os tamanhos são obtidos pelos sinais do movimento Browniano das nanopartículas (HOW *et al.*, 2013).

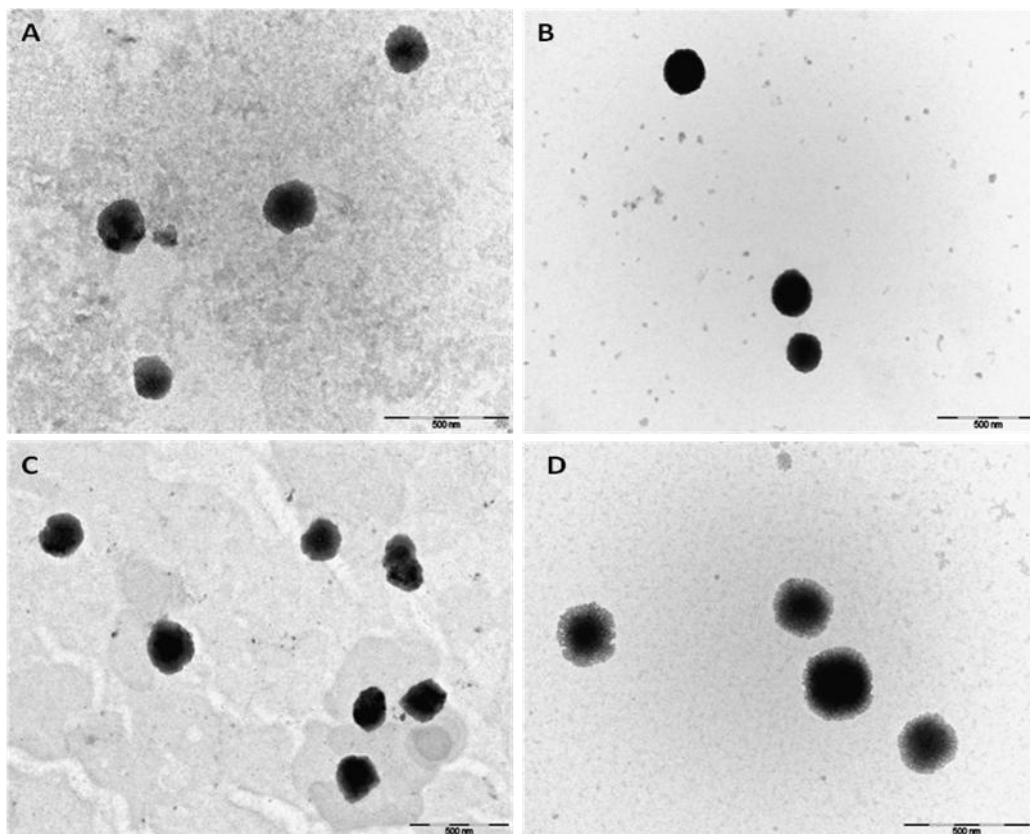


Figura 10: Imagens de MET das nanopartículas preparadas. (A): NLS inerte; (B): NLS-AICIPc; (C): CLN 20; (D): CLN 40

6.3- EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E TEOR

Um importante fator no que diz respeito à aplicação das NL como carreadores de fármacos é a sua capacidade de veiculá-los. A porcentagem de AICIPc incorporada nas NL foi avaliada pelo método indireto e observou-se que altas quantidades do fármaco foi encapsulada, provavelmente devido ao caráter lipofílico deste fotossensibilizador. O aumento na concentração de AO de 20% para 40% resultou no aumento da EE de 88,25% para 95,8%, valores mais altos que a EE das NLS que foi de 85,78% (Tabela 3). O mesmo ocorre para o teor que aumenta de 2,8% para 4,0% para os CLN e possui valores maiores que as NLS que foi de 2,2%. Estes resultados podem ser explicados pelas imperfeições na estrutura cristalina da matriz lipídica sólida, quando o

lipídio líquido é incorporado, resultando em maior espaço para acomodação do fármaco, ou seja, aumento da eficiência de encapsulação e da capacidade de veiculação do fármaco (DOKTOROVÁ *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011), porém, a EE e o teor máximos, dependem de uma ótima razão na mistura entre lipídio sólido e lipídio líquido (UPRIT *et al.*, 2013).

Tabela 3: Caracterização por Eficiência de Encapsulação e Teor das Nanopartículas Lipídicas desenvolvidas

Amostra	Eficiência de Encapsulação (%)	Teor (%)
NLS Inerte	-	-
NLS-AICIPc	85,78 +/- 0,03	2,23 +/- 0,02
CLN 20	88,25 +/- 0,01	2,81 +/- 0,01
CLN 40	95,8 +/- 0,03	4,00 +/- 0,02

Cada análise foi realizada em triplicata

6.4- ANÁLISE TÉRMICA

Devido à natureza cristalina do lipídio, o polimorfismo é uma característica que pode ocorrer em NL. Além disso, o aquecimento, a fusão, o resfriamento e a recristalização, que são etapas no processo de obtenção das NL, podem levar ao surgimento de transições entre os diversos estados polimórficos: instável (α), metaestável (β') e estável (β) (SILVA *et al.*, 2011). O AE é um ácido graxo saturado de caráter lipofílico, frequentemente escolhido como lipídio sólido para a produção de dispersões de NL (SEVERINO *et al.*, 2011) e possui quatro formas polimórficas identificadas, A, B, C e E (TEIXEIRA *et al.*, 2010; SEVERINO *et al.*, 2011).

Foram feitas análises de DSC do AE, NLS com e sem fármaco, e os CLN 20 (20% AO) e CLN 40 (40% AO), 3 meses após a preparação das formulações (Figura 11). O ponto de fusão do AE foi 57,6°C e foi relacionado

ao polimorfo B, que tem seu ponto de fusão relatado em 54°C (GARTI *et al.*, 1980). De acordo com a Tabela 4 e Figura 11, observa-se uma possível transição polimórfica da matriz lipídica sólida, já que a NLS inerte teve seu ponto de fusão em 68,1°C sugerindo a transição para o polimorfo C, termodinamicamente mais estável (ALMEIDA *et al.*, 2012) que pode ser obtido através da cristalização após fusão do lipídio (DAS; CHAUDHURY; 2011), que são etapas do processo de obtenção das NL.

Geralmente, moléculas de lipídios têm alta mobilidade em fases termodinamicamente instáveis (MEHNERT; MÄDER; 2012), e assim, para um sistema polimórfico, transições de fase para o polimorfo mais estável são inevitáveis, devido à direção termodinâmica para a minimização de energia (RINCÓN-CARDONA *et al.*, 2013). Essa transição polimórfica pode ser um grande problema para a veiculação de fármacos em sistemas carreadores lipídicos, devido a possibilidade de expulsão do princípio ativo durante o período de armazenamento. Como nas NL desenvolvidas houve a presença apenas da forma polimórfica mais estável, não haverá risco de expulsão do fármaco, ocasionado por mudanças na estrutura cristalina do lipídio durante o período de armazenamento das formulações.

Resultados semelhantes foram obtidos por ZARIWALA *et al.*, 2013, que através de análises de DSC do AE observou dois picos com pontos de fusão em 60,5°C e 71,2°C, indicando a presença de duas formas polimórficas, sendo a primeira a menos estável, e após a formação da NLS inerte o polimorfo menos estável desaparece, indicando uma completa transição para a forma polimórfica mais estável.

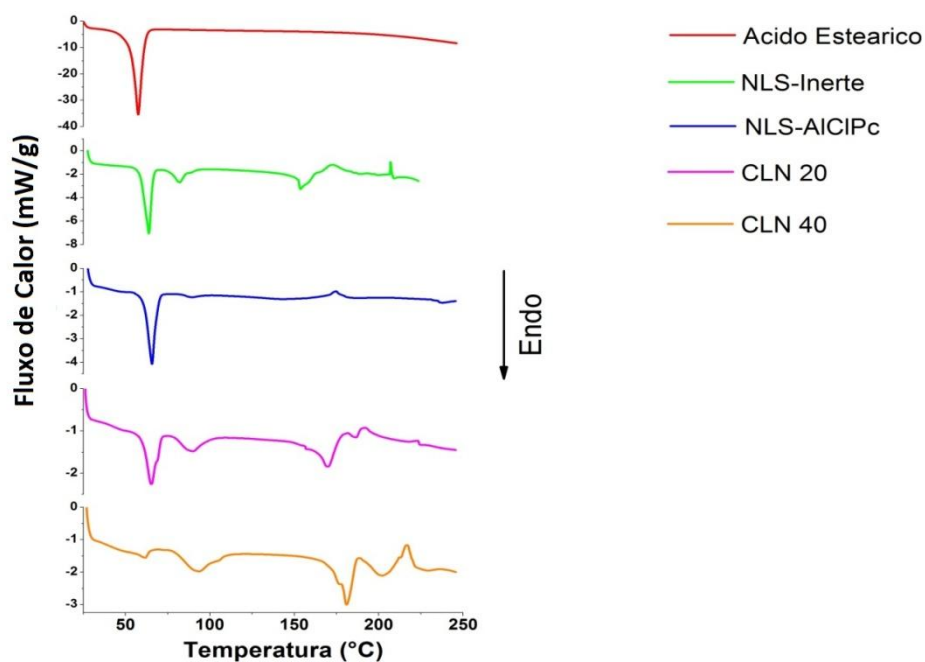


Figura 11: Curvas de DSC do AE, NLS inerte, NLS-AICIPc, CLN 20 e CLN 40.

Tabela 4: T_{onset} , Pico máximo, Entalpia de Fusão e Índice de Recristalização do AE, NLS inerte, NLS-AICIPc, CLN 20, CLN 40

	T_{onset} (°C)	Pico de Fusão (°C)	Entalpia de Fusão ΔH (J/g)	Índice de Recristalização (%)
Ácido Esteárico	41,4	57,6	-167,2	100,0
NLS inerte	58,7	68,1	-54,6	20,6
NLS-AICIPc	55,7	65,7	-34,8	13,1
CLN 20	54,8	65,2	-31,1	14,7
CLN 40	56,7	61,4	-20,4	12,8

A fim de avaliar a transição polimórfica do AE, foi feita a recristalização deste lipídio em etanol, nas mesmas condições de preparo das NL, já que no método de obtenção desses sistemas, o resfriamento, após fusão, leva à recristalização da fase lipídica e então ocorre a formação das NL (DE SOUZA *et al.*, 2012). A curva de DSC do AE recristalizado está representada na Figura 12 e observa-se um pico endotérmico em 53,2°C, que pode estar relacionado ao polimorfo B, menos estável (GARTI *et al.*, 1980). Outro evento endotérmico ocorre em 75,5°C, que pode estar relacionado ao polimorfo C mais estável (Almeida *et al.*, 2012) e o terceiro evento em 79,8°C que é relativo à presença de moléculas de etanol na amostra durante análise de DSC, já que tem seu ponto de ebulição relatado na literatura em 78-79°C.

Com esta análise por DSC, verifica-se que o método de obtenção das NL, nessas condições, promove a transição polimórfica do AE, da forma menos estável para a mais estável termodinamicamente.

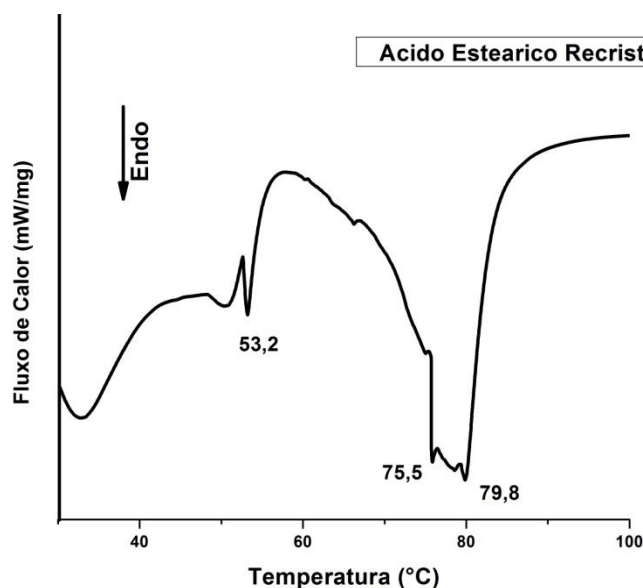


Figura 12: Curva de DSC do ácido esteárico recristalizado em etanol

A Figura 13 representa a curva de DSC da AICIPc onde observa-se um evento endotérmico em 157,05°C. ALMEIDA *et al.*, também observaram este evento endotérmico associado a uma pequena perda de massa verificado nas análises de termogravimetria que pode ter ocorrido devido à evaporação de

compostos voláteis (N_2 , O_2 , CO_2 e H_2O) ou a degradação de fragmentos químicos instáveis.

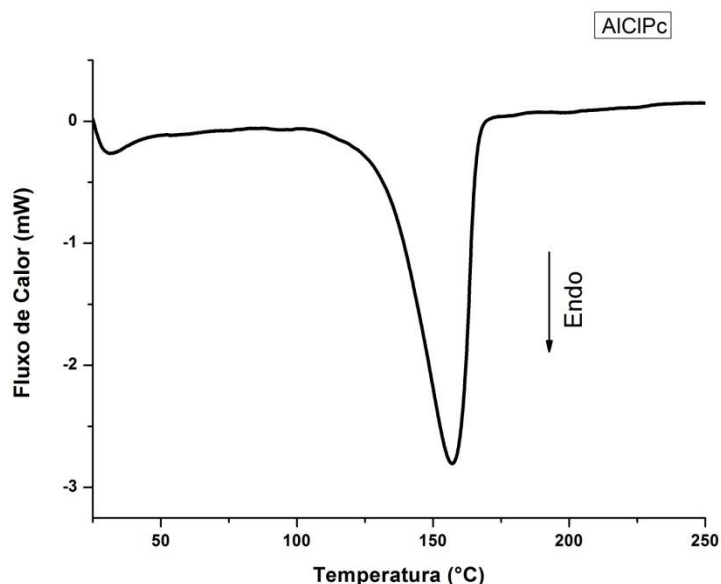


Figura 13: Curva de DSC da Alumínio-Cloro Ftalocianina

Quando a AlClPc é incorporada ao sistema, observa-se a diminuição no pico de fusão da NLS inerte em relação à NLS-AlClPc de $68,1^{\circ}C$ para $65,7^{\circ}C$ (Tabela 4), sugerindo a encapsulação do fármaco na matriz lipídica sólida das NL, o que resulta na diminuição da organização cristalina e consequentemente o ponto de fusão da NLS (NEGI *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram observados por KIM *et al.*, 2010; RAHMAN *et al.*, 2010, VAGHASIYA *et al.*, 2013 e ZARIWALA *et al.*, 2013, quando incorporaram o princípio ativo em NL.

Análises por DSC também são úteis para avaliar o grau de cristalinidade de lipídios, que foi estimado para o AE isolado e NL através da comparação das entalpias de fusão (ΔH) e do IR do AE e NL liofilizadas (MARTINS *et al.*, 2012). ΔH do AE, NLS inerte e NLS-AlClPc foi de $-167,2$ J/g, $-54,6$ J/g e $-34,8$ J/g, respectivamente, e o IR do AE, NLS inerte e NLS-AlClPc foi de 100%, 20,6% e 13,1%, respectivamente (Tabela 4). Uma diminuição na entalpia de fusão e IR das NLS inerte e NLS-AlClPc é observada quando comparadas ao

AE, e pode ser explicado pela interação entre o tensoativo e a matriz lipídica (KOVAČEVIĆ *et al.*, 2014), que gera uma tensão de superfície próximo à partícula, diminuindo seu tamanho e consequentemente, aumentando a área de superfície, o que reduz a energia necessária para ruptura da estrutura cristalina (ALI *et al.*, 2010), demonstrando estruturas menos cristalinas para as NLS comparadas ao AE.

Geralmente, a diminuição na temperatura de fusão em sistemas carreadores lipídicos, é dependente da concentração de lipídio líquido (SEVERINO *et al.*, 2011). RIBEIRO *et al.*, 2012 mostraram que a razão para a diminuição da cristalinidade do AE foi a quantidade de AO incorporada nas micropartículas lipídicas. Observa-se que o pico de fusão da NLS foi em 65,7°C e com a incorporação de 20% de AO essa temperatura de fusão reduziu minimamente para 65,2°C. Quando a concentração do lipídio líquido aumenta para 40%, a fusão ocorre em 61,4°C (Tabela 4). Esta diminuição no ponto de fusão dos CLN pode ser atribuído à interação do lipídio sólido com o lipídio líquido e o tensoativo, ou devido à diminuição do tamanho de partícula destes carreadores (TIWARI;PATHAK, 2011).

A adição do lipídio líquido na matriz lipídica sólida promove a formação de um cristal menos ordenado, gerando imperfeições na estrutura cristalina e consequentemente reduzindo a tendência do lipídio sólido recrystalizar. A cristalinidade reduzida dos CLN pode ser evidenciada pela diminuição da entalpia desses sistemas em relação às NLS (tabela 4).

Com a formação de um sistema nanoparticulado menos cristalino, há a diminuição no ponto de fusão e há a influência direta na EE e teor, já que maiores imperfeições no cristal geram mais espaços para a veiculação do fármaco. Dessa maneira, os resultados de DSC corroboram com a EE e teor obtidos no estudo onde foram obtidos maiores valores para CLN 40 > CLN 20 > NLS-AICIPc.

6.5- ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO - SAXS

Alguns materiais e sistemas podem espalhar raios-x a baixo ângulo se forem compostos por múltiplas fases com diferentes densidades eletrônicas e tamanho nanométrico (CASTRO *et al.*, 2009).

As curvas de SAXS do AE e das NL liofilizadas mostraram 3 picos de espalhamento bem definidos (Figura 14). O vetor de espalhamento q do AE, que corresponde aos picos de espalhamento possuem a relação $q_1:q_2:q_3 = 1:2:3$ (Tabela 5). Esta relação já é bem conhecida e é característica da periodicidade lamelar (ZHENG *et al.*, 2011; CHORILLI *et al.*, 2011; GU *et al.*, 2013). MARUYAMA *et al.*, 2001 mostraram por medidas de SAXS do AE, três picos de espalhamento com o mesmo intervalo entre eles, evidenciando a estrutura lamelar do lipídio (Figura 15).

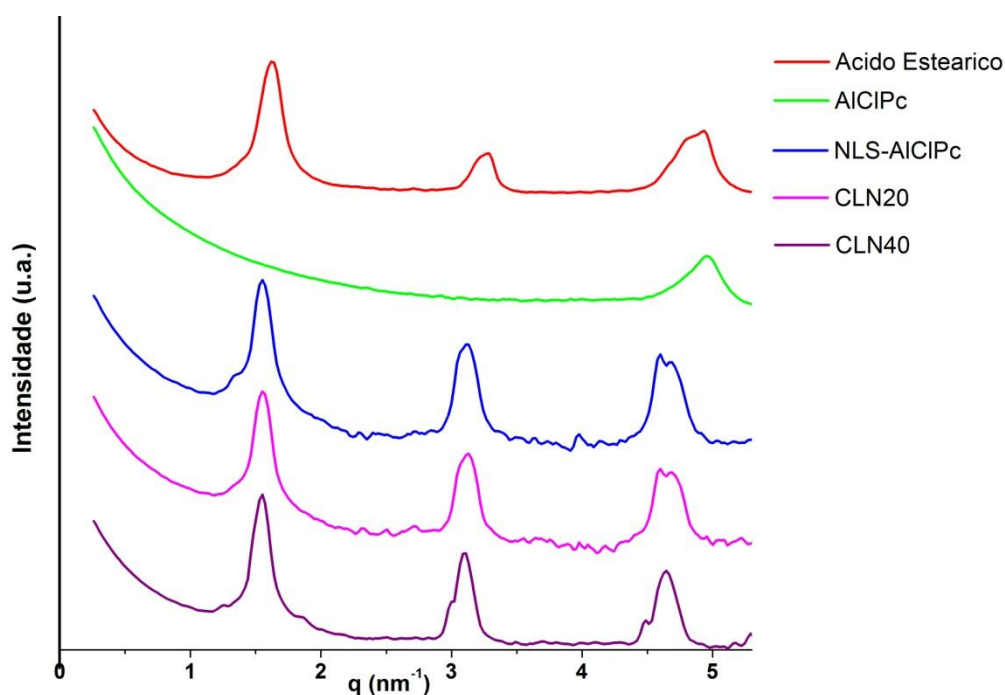


Figura 14: Curvas de SAXS do AE, AICIPc e NL liofilizadas

Tabela 5: Parâmetros de espalhamento obtidos nas curvas de SAXS.

	$q_1(\text{nm})$	$d_1(\text{nm})$	$q_2(\text{nm})$	$d_2(\text{nm})$	$q_3(\text{nm})$	$d_3(\text{nm})$
AE	1,61	3,9	3,25	3,86	4,93	3,82
AICIPc	4,95	1,27	-	-	-	-
NLS-AICIPc	1,55	4,05	3,12	4,04	4,6	4,09
CLN20	1,55	4,05	3,12	4,04	4,6	4,09
CLN40	1,55	4,05	3,1	4,05	4,64	4,06

Os picos de espalhamento para as NL também possui a relação $q_1:q_2:q_3 = 1:2:3$, indicando NL com microestruturas lamelares (Figura 14). A partir dos valores de q , é possível obter as distâncias repetidas aplicando a Lei de Bragg modificada (Equação 4), onde para estruturas lamelares, os picos são localizados em posições equidistantes (CODERCH *et al.*, 2007). Os parâmetros obtidos nas curvas de SAXS das NL (Tabela 5) mostram que o espaçamento interlamelar d é aproximadamente 4,1nm.

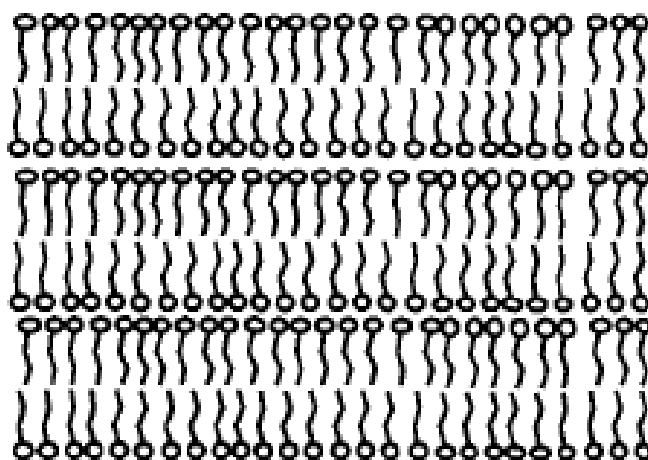


Figura 15: Representação esquemática da estrutura lamelar do Ácido Esteárico. (MARUYAMA *et al.*, 2001).

A AICIPc possui um pico de espalhamento em 4,95nm que não é observado nas NL contendo o fármaco. Este resultado confirma as análises de DSC que demonstra que o fármaco está disperso na sua forma amorfa dentro da estrutura cristalina da matriz lipídica sólida.

6.6- ESTUDO *IN VITRO* DE PERMEAÇÃO/PENETRAÇÃO CUTÂNEA

6.6.1 – AVALIAÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTROLE

As ftalocianinas possuem forte tendência de agregação devido à interação entre seus elétrons. A agregação geralmente é descrita como uma associação co-planar dos anéis progredindo de monômeros para dímeros afetando a forma da banda Q (YANIK *et al.*, 2009; KARAOĞLU *et al.*, 2012) e é dependente da concentração, natureza do solvente, íons metálicos complexados e temperatura (YANIK *et al.*, 2009). Esta agregação diminui a solubilidade destes componentes em muitos solventes, e afeta drasticamente suas propriedades espectroscópicas, fotofísicas, fotoquímicas e eletroquímicas (ÇAKIR *et al.*, 2013). Dessa maneira, a ação fotodinâmica de um fotossensibilizador está relacionada ao estado monomérico do fármaco e com isso os sistemas de liberação desempenham um importante papel de liberar o fármaco em seu local de ação na sua forma monomérica (ROSSETI *et al.*, 2011).

Foram obtidos espectros de absorção na região UV-VIS da AICIPc em três diferentes solventes, DMSO, etanol e PEG 300, para observar o comportamento de absorção do fármaco (Figura 16), pois é uma importante comparação qualitativa da sua eficiência de absorção (KLUSON *et al.*, 2008), além do potencial fotossensibilizador das ftalocianinas ser intensamente afetado devido à agregação das suas moléculas (GÜZEL *et al.*, 2013).

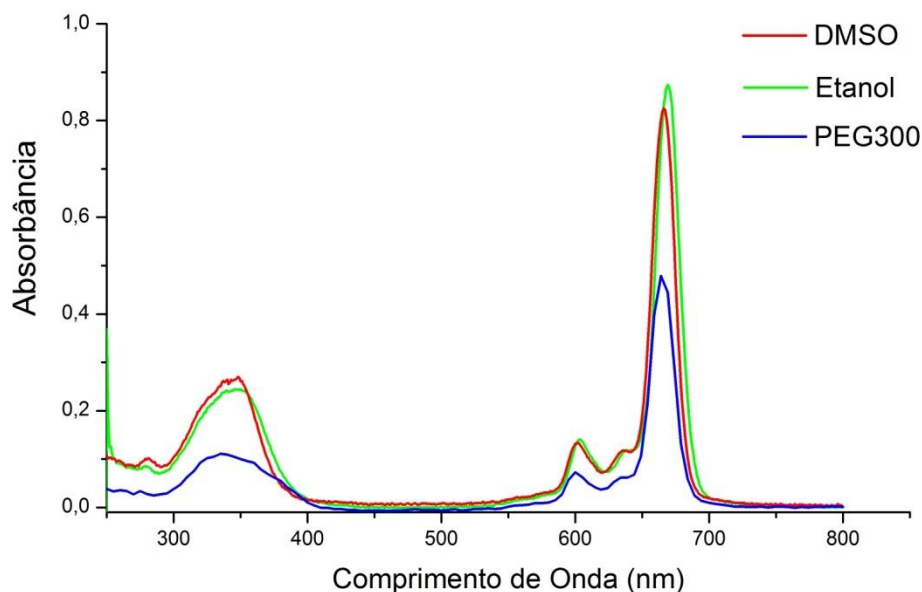


Figura 16: Espectros de absorção na região UV-VIS da AICIPc em diferentes solventes na concentração de 2µg/mL.

Geralmente as ftalocianinas exibem duas bandas características no espectro eletrônico na região do UV-vis, a banda Q e a banda de Soret ou B. A banda Q corresponde à transição eletrônica do mais alto orbital molecular ocupado para o mais baixo orbital não ocupado e é observada em 650-750nm e a banda B observada em 300-350nm no espectro eletrônico (ÇAKIR *et al.*, 2013).

Os espectros de absorção da AICIPc mostram uma baixa intensidade de absorção na banda de Soret e uma banda Q muito mais intensa. Nos três solventes, a AICIPc apresentou forte absorção na região do vermelho, em aproximadamente 670nm por uma única banda Q (Tabela 6), que corresponde à absorção monomérica (KLUSON *et al.*, 2008; BIYIKLIOĞLU *et al.*, 2010) e um pico vibracional em aproximadamente 602nm. A intensidade significativa desta banda é resultado de transições eletrônicas no sistema macrocíclico (GOLINSKI *et al.*, 2011). Observa-se também, com menos intensidade, uma banda B em aproximadamente 350nm. Estes espectros indicam a ausência de

formação de dímeros da AICIPc, também evidenciado por DE PAULA *et al.*, 2013 com este fármaco em Etanol.

De acordo com estes resultados, o PEG foi escolhido como solução controle nos estudos de permeação *in vivo* e *in vitro* devido a sua habilidade de solubilizar a AICIPc na forma monomérica (ROSSETI *et al.*, 2011), já que tanto o DMSO quanto o Etanol são promotores de permeação (LANE, 2013) e influenciariam nos estudos de permeação e penetração *in vitro* e *in vivo* da formulação controle.

Tabela 6: Caracterização Fotofísica da AICIPc em diferentes solventes

AICIPc-Solvente (2µ/mL)	UV-VIS* (nm)
DMSO	666
Etanol	669
PEG 300	664

* Comprimento de onda de máxima absorção na região UV-VIS

6.6.2 – AVALIAÇÃO IN VITRO DA PENETRAÇÃO/PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA AICIPc

Nos estudos de permeação cutânea *in vitro*, as concentrações encontradas da AICIPc no meio receptor após 24h de cinética, foram abaixo do limite de detecção por espectrofluorimetria no método de quantificação utilizado, ou seja, a AICIPc não permeia através da pele ficando retida no EC e nas camadas da pele, e assim pode evitar o risco de efeitos sistêmicos tóxicos provocados pela AICIPc. Devido a não permeação da AICIPc através da pele, estes estudos *in vitro* foram realizados durante 12h para quantificação da AICIPc retida no EC e nas outras camadas da pele.

Uma das funções mais importantes da pele é a proteção do organismo contra alguns danos que podem ser causados pelo ambiente, e para isso o EC

desempenha uma função essencial como barreira, mas também proporciona uma via por onde fármacos podem difundir durante a permeação (ASHTIKAR *et al.*, 2013).

Como resultados do estudo de penetração cutânea *in vitro*, foi observado que a quantidade de AICIPc retida no EC foi maior a partir da Formulação Controle, seguindo a seguinte ordem: Formulação Controle > NLS-AICIPc > CLN20 > CLN40, sendo significativamente maior na formulação controle em relação às formulações ($p < 0,01$) (Figura 17). Porém, a quantidade retida de fármaco nas camadas mais profundas da pele (epiderme + derme) foi maior quando as NL foram empregadas: CLN 40 > CLN 20 = NLS-AICIPc > Formulação Controle. Este resultado demonstra a capacidade que as NL possuem de penetrar a principal barreira e alcançar as principais camadas da pele, enquanto que grande quantidade da AICIPc livre da formulação controle fica retida no EC (em média, 73% da quantidade total retida na pele). Isso pode ser explicado devido ao efeito oclusivo causado na pele após a aplicação tópica de NL, melhorando a capacidade de penetração de fármacos através do EC, por aumentar a hidratação da pele (MEI *et al.*, 2003), além do maior contato da formulação com os corneócitos, devido ao tamanho nanométrico das NL (VAGHASIYA *et al.*, 2013).

Com relação à incorporação de AO à matriz lipídica, houve diferença significativa na quantidade de AICIPc retida no EC entre NLS-AICIPc e os CLN ($p < 0,05$), demonstrando melhor capacidade destes de penetrar a barreira lipídica, porém, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre CLN 20 e CLN 40. Já nas camadas mais profundas da pele, as formulações com AO (CLN) apresentaram melhores resultados enquanto que a formulação controle obteve a menor quantidade de AICIPc retida ($p < 0,01$), demonstrando que todas as NL desenvolvidas são carreadores de fármacos eficientes para aplicação tópica, pois possuem a capacidade de atravessar o EC liberando o fármaco na pele. A formulação CLN 40 apresentou a maior quantidade retida de fármaco nas camadas mais profundas da pele, em média, 89,5% da quantidade total de fármaco que penetrou na pele ficou retida na epiderme. Quantidade

significativamente maior em relação às demais formulações ($p < 0,01$) (Figura 17), evidenciando a função de promotor de penetração do AO. Outra alternativa para o maior acúmulo de AICIPc na epiderme da formulação CLN 40, é o seu menor tamanho de partícula, que favorece o acúmulo das nanopartículas entre os corneócitos, facilitando o transporte do fármaco para as camadas mais profundas da pele (KÜCHLER *et al.*, 2009)

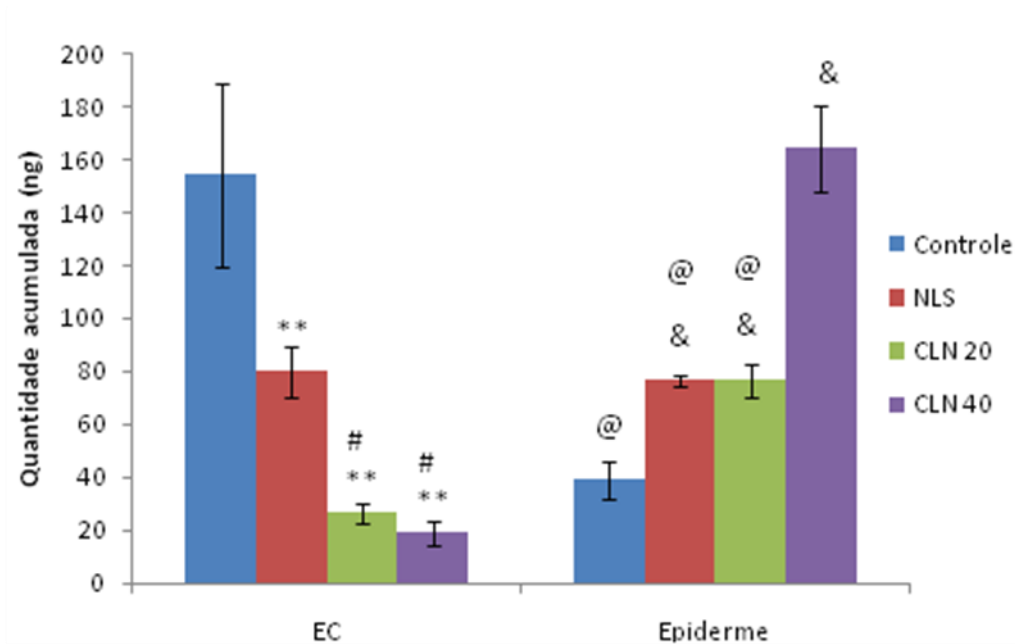


Figura 17: Retenção Cutânea de AICIPc da Formulação Controle e das dispersões lipídicas. A quantidade acumulada de AICIPc no EC e na epiderme está representada como média $\pm$ desvio padrão, para $n=3$ amostras. Para EC: ** $p < 0,01$ vs Controle; # $p < 0,05$ vs NLS-AICIPc. Para epiderme: & $p < 0,01$ vs Controle; @ $p < 0,01$ vs CLN 40 (ANOVA seguido de pós-teste de Tukey).

6.7- ESTUDO *IN VIVO* DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA

A eficácia da TFD no tratamento de lesões pré-cancerígenas e do câncer de pele não-melanoma, através da aplicação tópica de fotossensibilizadores de segunda geração, está relacionada principalmente com a capacidade dos sistemas de liberação melhorar a penetração do

fármaco em sua forma monomérica através do EC para que atinjam as células malignas presentes nas camadas viáveis da epiderme (ROSSETI *et al.*, 2011)

A penetração da AICI_{Pc} na pele de camundongos após 8h de tratamento está representada na Figura 18. A visualização qualitativa indica a localização do fármaco fluorescente nas diversas camadas da pele, assim, é possível observar que não há grande diferença na intensidade de fluorescência entre NLS-AICI_{Pc} e a formulação controle. Já a fluorescência observada dos CLN 20 e 40 foi maior em relação às demais formulações e claramente, CLN 40 teve uma maior intensidade de fluorescência da AICI_{Pc} nas camadas da pele corroborando com os resultados *in vitro*, sobre o efeito promotor dos CLN, que varia de acordo com a concentração de AO, além dos menores tamanhos de partículas para os CLN que também favorece o transporte do fármaco para camadas mais profundas da pele.

Os estudos *in vitro* e *in vivo* de penetração cutânea sugerem que a AICI_{Pc} veiculada em NL podem fornecer uma importante ferramenta para que este fármaco alcance as camadas mais profundas da pele e torne possível a realização da TFD do câncer de pele.

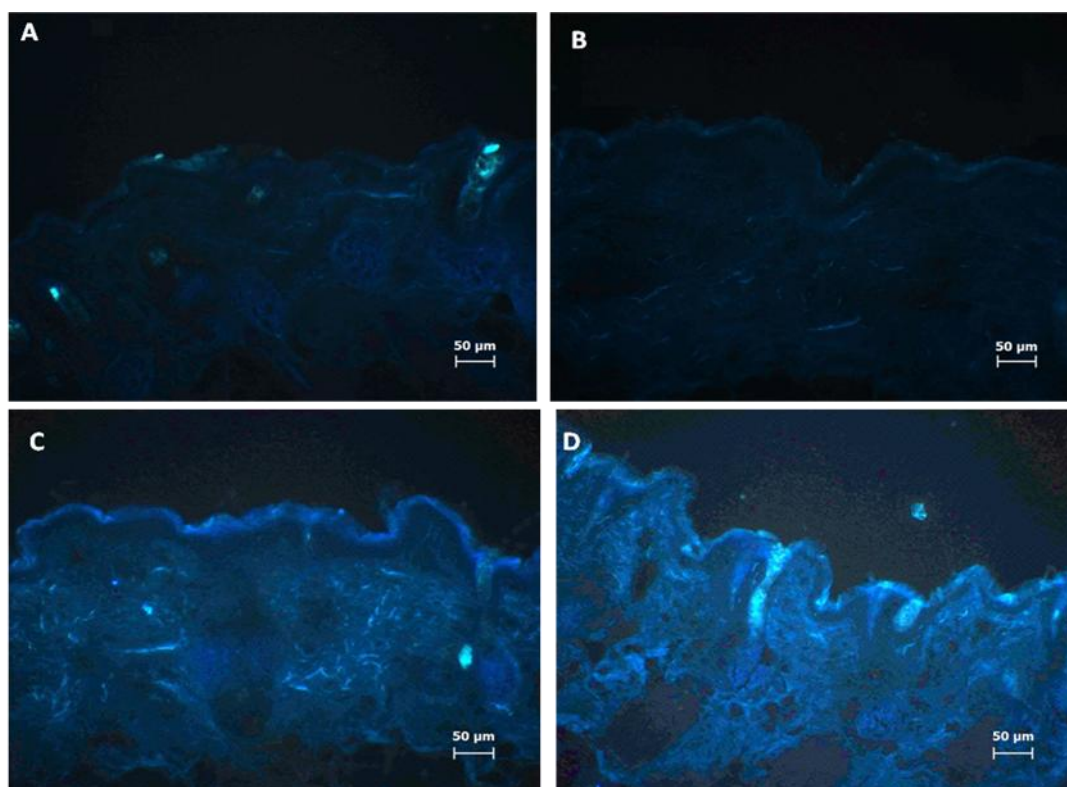


Figura 18: Imagens de Microscopia de Fluorescência da Penetração Cutânea da AICIPc veiculada em: A) Formulação Controle; B) NLS-AICIPc; C) CLN 20 e D) CLN 40

7. CONCLUSÃO

As NL desenvolvidas podem ser sistemas promissores para veiculação da AICIPc para posterior aplicação na TFD do câncer de pele pois apresentaram tamanhos, forma e EE apropriados e foram obtidas na sua forma polimórfica termodinamicamente mais estável. A AICIPc veiculada nesses sistemas fica retida na pele evitando efeitos tóxicos sistêmicos, sugerindo o efeito promotor de penetração proporcional ao aumento de AO nas formulações e ao menor tamanho de partícula.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL Y, PETKAR K C, SAWANT K K, Development, evaluation and clinical studies of Acitretin loaded nanostructured carriers for topical treatment of psoriasis. *Int J Pharm* 2010; 401: 93-102.

ALI H, EL-SAYED K, SYLVESTER P W, NAZZAL S. Molecular interaction and localization of tocotrienol-rich fraction (TRF) within the matrices of lipid nanoparticles: Evidence studies by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (^1H NMR). *Colloids Surf, B Biointerfaces* 2010; 77: 286-297.

ALLISON R R, MOTA H C, SIBATA C H. Clinical PD/PDT in North America: a historical review. *Photodiag Photodyn Ther* 2004; 1: 263-77.

ALLISON R R, CUENCA R E, DOWNIE G H, CAMNITZ P, BRODISH B, SIBATA C H. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers – A review of applications and outcome. *Photodiag Photodyn Ther* 2005; 2: 205-22.

ALLISON R R, SIBATA C H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiag Photodyn Ther* 2010; 7: 61-75.

ALLISON R R, MOGHISSI K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc* 2013; 46: 24-29.

ALLISON R R, MOGHISSI K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiag Photodyn Ther*. In press 2013.

ALMEIDA E D P, COSTA A A, SERAFINI M R, ROSSETI F C, MARCHETTI J M, SARMENTO V H V, et al. Preparation and characterization of chloroaluminum phthalocyanine – loaded solid lipid nanoparticles by thermal analysis and powder X-ray diffraction techniques. *J Therm Anal Calorim* 2012; 108: 191-6.

ARMSTRONG B K, KRICKER A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol, B, Biol* 2001; 63: 8-18.

ASHTIKAR M, MATTÄUS C, SCHMITT M, KRAFFT C, FAHR A. Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal Raman microscopy: First insights into the method. *Eur J Pharm Sci* 2013; 50: 601-8.

BECHET D, COULEAUD P, FROCHOT C, VIRIOT MARIE-LAURE, GUILLEMIN F, BARBERI-HEYOB M. Nanoparticles as vehicle for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol* 2008; 26(11): 612-21.

BERNAL C, COUTO A B, BREVIGLIERI S T, CAVALHEIRO E D G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. *Quim Nova* 2002; 25(5): 849-55.

BIYIKLIOĞLU Z, DURMUŞ M, KANTEKIN. Synthesis, photophysical and photochemical properties of quinoline substituted zinc (II) phthalocyanines and their quaternized derivatives. *J Photochem Photobiol, A, Chem* 2010; 211: 32-41.

BOIY A, DE WITTE P A M, ROLLANDTS R. Topical treatment of disseminated superficial actinic porokeratosis with hypericin – photodynamic therapy: A case report. *Photodiag Photodyn Ther* 2010; 7: 123-5.

BOZZINI G, COLIN P, BETROUNI N, NEVOUX P, OUZZANE A, PUECH P, et al. Photodynamic therapy in urology: What can we do now and where are we heading? *Photodiag Photodyn Ther* 2012; 9: 261-73.

BOZZINI G, COLIN P, BETROUNI N, MAURAGE C A, LEROY X, SIMIONIN S, et al. Efficiency of 5-ALA mediated photodynamic therapy on hypoxic prostate cancer: A preclinical study on the dunning R3327-AT2 rat tumor model. *Photodiag Photodyn Ther* 2013; 10: 296-303.

BRAATHEN L R, SZEIMES ROLF-MARKUS, BASSET-SEGUIN N, BISSONETE R, FOLEY P, PARISER D, et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 125-43.

BUGGIANI G, TROIANO M, ROSSI R, LOTTI T. Photodynamic therapy: Off-label and alternative use in dermatological practice. *Photodiag Photodyn Ther* 2008; 5(2): 134-8.

CAI X-J, LI W-M, ZHANG L-Y, WANG Z-W, LUO R-C, LI L-B. Photodynamic therapy for intractable bronchial lung cancer. *Photodiag Photodyn Therapy In Press* 2013.

CAKIR B O, ADAMSON P, CINGI C. Epidemiology and economic burden of nonmelanoma skin cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2012; 20: 419-22.

ÇAKIR D, ÇAKIR V, BIYIKLIOĞLU Z, DURMUŞ M, KANTEKIN H. New water soluble cationic zinc phthalocyanines as potential for photodynamic therapy of cancer. *J Organomet Chem* 2013; 745-746: 423-31.

CALIFANO J, NANCE M. Malignant Melanoma. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2009; 17: 337-48.

CALIN M A, PARASCA S V. Photodynamic therapy in oncology. *J Optoelectron Adv Mat* 2006; 8(3): 1173-9.

CAMERIN M, MAGARAGGIA M, SONCIN M, JORI G, MORENO M, CHAMBRIER I. The in vivo efficacy of phthalocyanine-nanoparticles conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *Eur J Cancer* 2010; 46: 1910-18.

CASTANO A P, DEMIDOVA T N, HAMBLIN M R. Mechanisms in photodynamic therapy: par tone – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag Photodyn Ther* 2004; 1: 279-93.

CHATTERJEE D K, FONG L S, ZHANG Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 1627-37.

CHEN J, GAN Q, LI S, GONG F, WANG Q, YANG Z, et al. The effects of central metals and peripheral substituents on the photophysical properties and optical limiting performance of phthalocyanines with axial chloride ligand. *J Photochem Photobiol, A, Chem* 2009; 207: 58-65.

CHUMMUN S, MC LEAN N R. Management of malignant skin cancer. *Surgery (Oxford)* 2011; 29(10): 529-33.

CIRRI M, BRAGAGNI M, MENNINI N, MURAP. Development of a new delivery system consisting in “drug – in cuclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for ketoprofen topical delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 80: 46-53.

COBANOGLU H B, CONSTANTINIDES M, URAL A. Nonmelanoma skin cancer of the head and neck: Molecular Mechanisms. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2012; 20(4): 437-43.

CORREIA R F, ANDRADE S M, VISEU M I. Aggregation and disaggregation of anionic aluminum phthalocyanines pré-micelle and micelle media: A fluorescence study. *J Photochem Photobiol, A, Chem* 2012; 235: 21-8.

COUNCIL M L. Common skin cancers in older adults: Approach to diagnosis and management. *Clin Geriatr Med* 2013; 29(2): 361-72.

CRAMERS P, RUEVEKAMP M, OPPELAR H, DALESIO O, BASS P, STEWART F A. Foscan® uptake and tissue distribution in relation to photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2003; 88: 283-90.

CUMMINS D L, CUMMINS J M, PANTLE H, SILVERMAN M A, LEONARD A L, CHANMUGAM A. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(4): 500-07.

DAS S, CHAUDHURY A. Recent advances in lipid nanoparticles formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech* 2011; 12(1): 62-76.

DAS A, STÖCKELHUBER K W, JURK R, JEHNICHEN D, HEINRICH G. A general approach to rubber-montmorillonite nanocomposites: Intercalation of stearic acid. *Appl Clay Sci* 2011; 51: 117-25.

DAS S, NG W K, TAN R B H. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 47: 139-51.

DE PAULA C S, TEDESCO A C, PRIMO F L, VILELA J M C, ANDRADE M S, MOSQUEIRA V C F. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles

as photosensitizers: Photophysical and physicochemical characterization, release and phototoxicity *in vitro*. Eur J Pharm Sci 2013; 49: 371-81.

DE SOUZA A L R, ANDREANI T, NUNES F M, CASSIMIRO D L, DE ALMEIDA A E, RIBEIRO C A, et al. Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles – Studies by DSC and SAXS. J Therm Anal Calorim 2012; 108: 353-60.

DOKTOROVÁ S, ARAÚJO J, GARCIA M I, RAKOVSKÝ E, SOUTO E B. Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured carriers(PEG-NLC). Colloids Surf, B Biointerfaces 2010; 75: 538-42.

DONG Y, NG W K, SHEN S, KIM S, TAN R B H. Solid lipid nanoparticles: Continuous and potential large-scale nanoprecipitation production in static mixers. Colloids Surf, B Biointerfaces 2012; 94: 68-72.

ENGLISH D R, ARMSTRONG B K, KRICKER A, WINTER M G, HEENAN P J, RANDELL P L. Demographic characteristics, pigmentary and cutaneous risk factors for squamous cell carcinoma of the skin: a case-control study. Int J Cancer 1998; 76: 628-34.

ERMERTCAN A T, HELLINGS P W, CINGI C. Non melanoma skin cancer of the head and neck: nonsurgical treatment. Facial Plast Surg Clin North Am 2012; 20: 445-54.

FANG J-Y, FANG C-L, LIU C-H, SU Y-H. lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). Eur J Pharm Biopharm 2008; 70: 633-40.

GALICZYNSKI E M, VIDIMOS A T. Nonsurgical treatment of nonmelanoma skin cancer. Dermatol Clin 2011; 29: 297-309.

GARTI N, SARIG S, WELLNER E. Determination of the composition of mixtures of fatty acid polymorphs by DTA. Thermochim Acta 1980; 37: 131-6.

GOLINSKI T, OSMALEK T, KONOPKA K, WIERZCHOWSKI M, FITA P, MIELCAREK J. Photophysical properties and photocytotoxicity of novel phthalocyanines – potentially useful for their application in photodynamic therapy. Polyhedron 2011; 30: 1538-46.

GORDON R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. Semin Pediatr Neurol 2013; 29 (3): 160-69.

GREINERT R. Skin Cancer: new markers for better prevention. Pathobiology 2009; 76: 64-81.

GREINERT R, BONIOL M. Skin cancer – Primary and secondary prevention (information campaigns and screening) – with a focus on children & sunbeds. Prog Biophys Mol Bio 2011; 107: 473-76.

GU Y, SHI L, GAO H, LI J, ZHENG L. Phase behavior of didecylpyrrolidinium bromide in aqueous solution. *Colloids Surf A, Physicochem Eng Asp* 2013; 420: 82-8.

GUPTA M, VYAS S P. Development, characterization and *in vivo* assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. *Chem Phys Lipids* 2012; 165: 454-61.

GÜZEL E, ATSAY A, NALBANTOGLU S, ŞAKI N, DOĞAN A L, GÜL A, et al. Synthesis, characterization and photodynamic activity of a new amphiphilic zinc phthalocyanine. *Dyes Pigm* 2013; 97: 238-43.

HALEM M, KARIMKHANI C K. Dermatology of the head and neck: Skin cancer and benign skin lesions. *Dent Clin North Am* 2012; 56: 771-90.

HAMDOON Z, JERJES W, UPILE T, HOPPER C. Optical coherence tomography-guided photodynamic therapy for skin cancer: Case study. *Photodiag Photodyn Therapy* 2011; 8: 49-52.

HAN F, YIN R, CHE X, YUAN J, CUI Y, YIN H, et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) based topical gel of flurbiprofen: Design, characterization and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm* 2012; 439: 349-57.

HANSEN T J, ANDERSON B E. Eletrodessication and curettage for low-risk cutaneous malignancies of the head and neck. *Operative Techniques in Otolaryngology* 2013; 24: 55-58.

HELGASON T, AWAD T S, KRISTBERGSSON K, MCCLEMENTS D J, WEISS J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Colloid Interface Sci* 2009; 334: 75-81.

HENDERSON B W, DOUGUERTY T. How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and photobiology* 1992; 55(1): 145-57.

HOPPER C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2000; 1: 212-19.

HOU D, XIE C, HUANG K, ZHU C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* 2003; 24: 1781-85.

HOW C W, RASEDEE A, MANICKAM S, ROSLI R. Tamoxifen-loaded nanostructured lipid carrier as a drug delivery system: Characterization, stability assessment and cytotoxicity. *Colloids Surf, B Biointerfaces* 2013; 112: 393-99.

HU F Q, YUAN H, ZHANG H H, FANG M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int J Pharm* 2002; 239: 121-8.

HU F Q, JIANG S P, DU Y Z, YUAN H, YE Y Q, ZENG S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids Surf, B Biointerfaces* 2005; 45: 167-73.

HU F Q, ZHANG Y, ZHONG D Y, YUAN H. Nimodine loaded lipid nanospheres prepared by solvent diffusion method in a drug saturated aqueous system. *Int J Pharm* 2008; 348: 146-52.

HUO J, ZHOU A-W. New research on development of solid lipid nanoparticles. *J Med Colleges* 2007; 22(6): 385-90.

IBBOTSON S H. An overview of topical photodynamic therapy in dermatology. *Photodiag Photodyn Ther* 2010; 7: 16-23.

IKEDA H, TOBITA T, OHBA S, UEHARA M, ASAHINA I. Treatment outcome of Photofrin-based photodynamic therapy for T1 and T2 oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Photodiag Photodyn Ther* 2013; 10: 229-35.

INGRAFFEA A. Melanoma. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2013; 21: 33-42.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Tipos de câncer [acesso em 27 ago. 2013]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br>

ISHIZUKA M, ABE F, SANO Y, TAKAHASHI K, INOUE K, NAKAJIMA M, et al. Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnosis and therapy. *Immunopharmacology* 2011; 11: 358-65.

JENNING V, SCHÄFER-KOERTING M, GOHLA S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J Control Release* 2000; 66: 115-26.

JIANG Z, SHAO J, YANG T, WANG J, JIA L. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *J Pharm Biomed Anal*. In press 2013

JOSEFSEN L B, BOYLE R W. Photodynamic therapy and development of metal-based photosensitisers. *Metal-Bases Drugs* 2008 (2008) 276109.

JOSHI M, PATRAVALE V. Nanostructured lipid carrier (NLC) based gel of celecoxib. *Int J Pharm* 2008; 346: 124-32.

JOSHI M D, MÜLLER R H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 161-72.

KARAOĞLU H R P, KOCA A, KOÇAK M B. Synthesis, electrochemical and spectroelectrochemical characterization of novel soluble phthalocyanines bearing chloro and quaternizable bulky substituents on peripheral positions. *Dyes Pigm* 2012; 92: 1005-17.

KARÁSKOVÁ M, RAKUŠAN J, LYČKA A, ČERNÝ J, CERMÁK J. Preparation and characterization of aluminium phthalocyanine acetate, propionate and benzoate. *Tetrahedron Lett* 2012; 53: 4056-8.

KESSEL D, VICENTE M G H, REINERS JR J J. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 2006; 38(5): 482-8.

KHURANA S, BEDI P M S, JAIN N K. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. *Chem Phys Lipids* 2013; 175-176: 65-72.

KIM J-K, PARK J-S, KIM C-K. Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release. *Int J Pharm* 2010; 383: 209-15.

KLUSON P, DROBEK M, KALAJI A, ZARUBOVA S, KRYSA J, RAKUSAN J. Singlet oxygen photogeneration efficiencies of a serie of phthalocyanines in well-defined spectral regions. *J Photochem Photobiol, A, Chem* 2008; 199: 267-73.

KOLAROVA H, LENOBEL R, KOLAR P, STRNAD M. Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine. *Toxicol in vitro* 2007; 21: 1304-6.

KONAN Y N, GURNY R, ALLEMAN E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol, B, Biol* 2002; 66: 89-106.

KONDO K, MIYOSHI T, FUJINO H, TAKIZAWA H, IMAI S, KOBAYASHI N, et al. Photodynamic therapy using a second generation photosensitizer, Telaporfin. *Photodiag Photodyn Ther* 2007; 4: 269-74.t

KOVAČEVIĆ A B, MÜLLER R H, SAVIĆ S D, VULETA G M, KECK C M. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids Surf A, Physicochem Eng Asp* 2014; 444: 15-25.

KUBIN A, WIERRANI F, BURNER U, ALTH G, GRÜNBERGER W. Hypericin – The facts about a controversial agent. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 233-53.

KÜBLER A C. Photodynamic therapy. *Medical Laser Application* 2005; 20: 37-45.

KÜCHLER S, RADOWSKI M R, BLASCHKE T, DATHE M, PLENDL J, HAAG R, et al. Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 243-50.

KUMAR S, RANDHAWA J K. Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf, B Biointerfaces* 2013; 102: 562-8.

KUNTSCHKE J, BUNJES H, FAHR A, PAPPINEN S, RÖNKÖ S, SUHONEN M, et al. Interaction of lipid nanoparticles with human epidermis and an organotypic cell culture. *Int J Pharm* 2008; 354: 180-95.

KWAN W, WILSON D, MORAVAN V. Radiotherapy for locally advanced basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60(2): 406-11.

- LANE M E. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 2013; 447: 12-21.
- LAZARETH V. Management of non-melanoma skin cancer. *Semin Oncol Nurs* 2013; 29(3): 182-94.
- LEE Y, BARON E D. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 2011; 30(4): 199-209.
- LIM S B, BANERJEE A, ÖNYÜKSEL H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. *J Control Release* 2012; 163: 34-45.
- LIU K, WANG Y, YAO J, LUO Y. Origin of the Q-band splitting in the absorption spectra of aluminium phthalocyanine chloride. *Chem Phys Lett* 2007; 438:36-40.
- LIU C-H, WU C-T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids Surf A, Physicochem Eng Asp* 2010; 353: 149-56.
- LIU D, LIU Z, WANG L, ZHANG C, ZHANG N. Nanostructured lipid carries as a novel carries for parenteral delivery of docetaxel. *Colloids Surf, B Biointerfaces* 2011; 85: 262-9.
- LOKESH K S, ADRIAENS A. Synthesis and characterization of tetra-substituted palladium phthalocyanine complexes. *Dyes Pigm* 2013; 96: 269-277.
- LONGO J P F, LOZZI S P, SIMIONI A R, MORAIS P C, TEDESCO A C, AZEVEDO R B. Photodynamic therapy with aluminium-chloro phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *Photochem Photobiol, B, Biol* 2009; 94: 143-6.
- LOPEZ R F V, LANGE N, GUY R, BENTLEY M V L B. Photodynamic therapy of skin câncer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 77-94.
- LOPEZ R, ELEUTÉRIO C V, GONÇALVES L M D, CRUZ M E M, ALMEIDA A J. Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45: 442-50.
- LOVE W E, BERNHARD J D, BORDEAUX J S. Topical Imiquimod or Fluoracil therapy for basal and squamous cell carcinoma. A systematic review. *Arch Dermatol* 2009; 145(12): 1431-38.
- LV Q, YU A, XI Y, LI H, SONG Z, CHI J. Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *Int J Pharm* 2009; 372: 191-8.
- MACCORMACK M A. Photodynamic therapy. *Adv Dermatol* 2006; 22: 219-58.
- MACHADO A E DA H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Quim Nova* 2000; 23(2): 237-43.

MADAN V, LEAR J T, SZEIMIES R. Non melanoma skin cancer. *Lancet* 2010; 375: 673-85.

MANEA A-M, VASILE B S, MEGHEA A. Antioxidant and antimicrobial of green tea extract loaded into nanostructured lipid carriers. *C R Chimie*. In Press 2013.

MANG T S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiag Photodyn Ther* 2004; 1: 43-8.

MARCHAL S, FRANÇOIS A, DUMAS D, GUILLEMIN F, BEZDETNYA L. Relationship between subcellular localisation of Foscan® and caspase activation in photosensitized MCF-7 cells. *Br J Cancer* 2007; 96: 944-51.

MARQUELE-OLIVEIRA F, SANTANA D C DE A, TAVEIRA S F, VERMEULEN D M, DE OLIVEIRA A R M, DA SILVA R S, et al. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53: 843-51.

MARTINS S, COSTA-LIMA S, CARNEIRO T, CORDEIRO-DA-SILVA A, SOUTO E B, FERREIRA D C. Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: Na investigation of the uptake mechanism and pathway. *Int J Pharm* 2012; 430: 216-27.

MARTINS S, THO I, SOUTO E, FERREIRA D, BRANDL M. Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45: 613-23.

MARUYAMA T, NAKAJIMA M, ICHIKAWA S, SANO Y, NABETANI H, FURUSAKI S, et al. Small-angle x-ray scattering analysis of stearic acid modified lipase. *Biosc Biotechnol Biochem* 2001; 65(4): 1003-6.

MEHNERT W, MÄDER K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Reviews* 2001; 47(2-3): 165-96.

MEHNERT W, MÄDER K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Reviews* 2012; 64: 83-101.

MEI Z, CHEN H, WENG T, YANG Y, YANG X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56: 189-96

MEI Z, LI X, WU Q, HU S, YANG X. The research on the anti-inflammatory activity and hepatotoxicity of triptolide-loaded solid lipid nanoparticle. *Pharmacol Res* 2005; 51: 345-51.

MENDES A I, SILVA A C, CATITA J A M, CERQUEIRA F, GABRIEL C, LOPES C M. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery for oral mucosa: Improving antifungal activity. *Colloids Surf, B Biointerfaces* 2013; 111: 755-63.

MITTON D, ACKROYD R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiag Photodyn Ther* 2008; 5: 103-11.

MOOR A C E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol, B, Biol* 2000; 57: 1-13.

MORTON C A, MCKENNA K E, RHODEST L E. Guidelines for topical photodynamic therapy: update. *Br J Dermatol* 2008; 159: 1245-66.

MUFTI S T. Pattern of skin cancer among Saudi patients who attend King AbdulAziz University Hospital between Jan 2000 and Dec 2010. *Journal of the Saudi Society of Dermatology & Dermatologic Surgery* 2012; 16: 13-18.

MÜLLER R H, MEHNERT W, LUCKS J S, SCHWARZ C, ZUR MÜHLEN A, WEYHERS H. Solid lipid nanoparticles (SLN) – an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur J Pharm* 1995; 41: 62-9.

MÜLLER R H, MÄDER K, GOHLA S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 161-77.

MÜLLER R H, RADTKE M, WISSING S A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm* 2002; 242: 121-8.

MÜLLER R H, PETERSON R D, HOMMOS A. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Reviews* 2007; 59: 522-30.

MÜLLER R H, RUNGE S A, RAVELLI V. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 68: 535-44.

NAAHIDI S, JAFARI M, EDALAT F, RAYMOND K, KHADEMHOSEINI A, CHEN P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release* 2013; 166: 182-94.

NAWALANY K, RUSIN A, KEPCZYSKI M, FILIPCZAK P, KUMOREK M, KOZIK B, et al. Novel nanostructural photosensitizers for photodynamic therapy: *In vitro* studies. *Int J Pharm* 2012; 430: 129-140.

NEGI J S, CHATTOPADHYAY P, SHARMA A K, RAM V. Development of solid lipid nanoparticles (SLNs) of lopinavir using hot self nano-emulsification (SNE) technique. *Eur J Pharm Sci* 2013; 48: 231-39.

NUÑO-GONZÁLEZ A, VICENTE-MARTÍN F J, PINEDO-MORALEDA F, LÓPEX-ESTEBARANZ. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *Actas Dermosifiliogr* 2012; 103(7): 567-78.

NYMAN E S, HYNNIEN P H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol, B, Biol* 2004; 73: 1-28.

PALEWSKA K, SWORAWOWSKI J, LIPÍŃSKI. Molecular aggregation in soluble phthalocyanines – Chemical interactions vs. π -stacking. *Opt Mater* 2012; 34: 1717-24.

PARDEIKE J, HOMMOS A, MÜLLER R H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm* 2009; 366: 170-84.

PASZKO E, EHRHARDT C, SENGUE M O, KELLEHER D P, REYNOLDS J V. Nanodrug application in photodynamic therapy. *Photodiag Photodyn Ther* 2011; 8: 14-29.

PIETTE J, VOLANTI C, VANTIEGHEM A, MATROULE JEAN-YVES, HABRAKEN Y, AGOSTINIS P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1651-59.

PRIYANKA K, ABDUL H S A. Preparation and evaluation of Montelukast Sodium loaded solid lipid nanoparticles. *J Young Pharm* 2012; 4(3): 129-37.

PROMBUTARA P, KULWATTHANASAL Y, SUPAKA N, SRAMALA I, CHAREONPORNWATTANA S. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control* 2012; 24: 184-90.

PUGLIA C, BLASI P, RIZZA L, SCHOUBBEN A, BONINA F, ROSSI C, et al. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. *Int J Pharm* 2008; 357: 295-304.

RAHMAN Z, ZIDAN A S, KHAN M A. Non-destructive of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 76: 127-37.

RIBEIRO M D M M, ARELLANO D B, GROSSO C R F. The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process. *Food Res Int* 2012; 47: 38-44.

RIDOLFI D M, MARCATO P D, JUSTO G Z, CORDI L, MACHADO D, DURÁN N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. *Colloids Surf, B Biointerfaces* 2012; 93: 36-40.

RINCÓN-CARDONA J A, MARTINI S, CANDAL R J, HERRERA M L. Polymorphic behavior during isothermal crystallization of high stearic high oleic sunflower oil stearins. *Hood Res Int* 2013; 51: 86-97.

ROOK A H, WOOD G S, DUVIC M, VONDERHEID E C, TOBIA A, CABANA B. A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63(6): 984-90.

ROSE R F, STABLES G I. Topical photodynamic therapy in the treatment of hidradenitis suppurativa. *Photodiag Photodyn Ther* 2008; 5: 171-5.

ROSSETI F C, LOPES L B, CAROLLO A R H, THOMAZINI J A, TEDESCO A C, BENTLEY M V L B. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J Control Release* 2011; 155: 400-8.

SANCHÉZ G, NOVA J, DE LA HOZ F. Risk factors for basal cell carcinoma: A study from the National Dermatology Center of Colombia. *Actas Dermosifiliogr* 2012; 103(4): 294-300.

SANCHEZ G, NOVA J. Risk factors for squamous cell carcinoma, a study by the Nacional Dermatology Centre of Colombia. *Actas Dermosifiliogr*. In Press 2013.

SCHÄFER-KORTING M, MEHNERT W, KORTING H-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Reviews* 2007; 59: 427-43.

SELMAN S H. Photodynamic therapy for prostate cancer: One urologist's perspective. *Photodiag Photodyn Ther* 2007; 4: 26-30.

SEVERINO P, PINHO S C, SOUTO E B, SANTANA M H A. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. *Colloids Surf, B Biointerfaces* 2011; 86: 125-30.

SHAFIRSTEIN G, FRIEDMAN A, SIEGEL E, MORENO M, BÄUMLER W, FAN C, et al. Using 5-aminolevulinic acid and pulsed dye laser for photodynamic treatment of oral leukoplakia. *ArchOtolaryngol Head Neck Surg* 2011; 137(11): 1117-23.

SHARMAN W M, ALLEN C M, VAN LIER J E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999; 4(11): 507-17.

SHARQUIE K E, NOAIMI A A. Basal cell carcinoma: Topical therapy versus surgical treatment. *Journal of the Saudi Society of Dermatology & Dermatologic Surgery* 2012; 16: 41-51.

SILVA A C, GONZÁLEZ-MIRA E, GARCIA M L, EGEA M A, FONSECA J, SILVA R, et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone – loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids Surf, B Biointerfaces* 2011; 86: 158-65.

SIMPLICIO F I, MAIONCHI F, HIOKA N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova* 2002; 25(5): 801-7.

SIQUEIRA-MOURA M P, PRIMO F L, PETI A P F, TEDESCO A C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. *Pharmazie* 2010; 65: 1.

SOLER A M, WARLOE T, BERNER A, GIERCKSKY K E. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate – based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol* 2001; 145: 467-71.

SOUTO E B, WISSING S A, BARBOSA C M, MÜLLER R H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm* 2004; 271: 71-7.

SUBED R K, KANG K W, CHOI H-K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. *Eur J Pharm Sci* 2009; 37: 508-13.

SWATHI G, PRASANTHI N L, MANIKIRAN S S, RAMARAO N. Solid lipid nanoparticles: colloidal carrier systems for drug delivery. *Int J Pharm Sci Res* 2010; 1(12): 1-16.

TAPAJÓS E C C, LONGO J P, SIMIONI A R, LACAVA Z G M, SANTOS M F M A, MORAIS P C, et al. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine 2008; 44:1073-79.

TEERANACHAIDEKUL V, BOONME P, SOUTO E B, MÜLLER R H, JUNYAPRASERT V B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red – loaded NLC. *J Control Release* 2008; 128: 134-41.

TEIXEIRA A C T, GARCIA A R, ILHARCO L M, DA SILVA A M P S G, FERNANDES A C. Phase behavior of oleanolic acid, pure, mixed with stearic acid: interactions and crystallinity. *Chem Phys Lipids* 2010; 163: 655-66.

TENG I-T, CHANG Y-J, WANG L S, LU H-Y, WU L-C, YANG C-M et al. Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials* 2013; 34: 7462-7470.

TIWARI R, PATHAK K. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *Int J Pharm* 2011; 415: 232-43.

TRIESSCHEIJN M, BAAS P, SCHELLENS J H M, STEWART F A. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* 2006; 11: 1034-44.

UPRIT S, SAHU R K, ROY A, PARE A. Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2013; 21: 379-86.

USLAN C, SESALAN B Ş, DURMUŞ M. Synthesis of new water soluble phthalocyanines and investigation of their photochemical, photophysical and biological properties. *J Photochem Photobiol, A, Chem* 2012; 235: 56-64.

VAGHASIYA H, KUMAR A, SAWANT K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *Eur J Pharm Sci* 2013; 49: 311-22.

VITORINO C, ALMEIDA J, GONÇALVES L M, ALMEIDA A J, SOUSA J J, PAIS A A C C. Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: From experimental design to the molecular detail. *J Control Release* 2013; 167: 301-314.

VITTAR N B R, PRUCCA C G, STRASSET C, AWRUCH J, RIVAROLA V A. Cellular inactivation and antitumor efficacy of a new zinc phthalocyanine with potential use in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2192-2205.

WANG S, CHEN T, CHEN R, HU Y, CHEN M, WANG Y. Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies. *Int J Pharm* 2012; 430: 238-46.

WEBER S, ZIMMER A, PARDEIKE J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*. In Press 2013.

WISSING S A, MÜLLER R H. The influence of the cristallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *Int J Pharm* 2002; 242: 377-9.

WISSING, S A, MÜLLER R H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56: 67-72.

WISSING S A, KAYSER O, MÜLLER R H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Reviews* 2004; 56: 1257-72.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [Acesso em 23 set. 2013]. Disponível em: www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html.

YANIK H, AYDIN D, DURMUŞ M, AHSEM V. Peripheral and non-peripheral tetrasubstituted aluminium, gallium and indium phthalocyanines: Synthesis, photophysics and photochemistry. *J Photochem Photobiol, A, Chem* 2009; 206: 18-26.

YANO S, HIROHARA S, OBATA M, HAGIYA Y, OGURA S, IKEDA A, et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol C, Photochem rev* 2011; 12: 46-67.

ZARIWALA M G, ELSAID N, JACKSON T L, LÓPEZ F C, FERNAUD S, SOMAVARAPU S, et al. A novel approach to oral iron delivery ferrous sulphate loaded solid lipid nanoparticles. *In J Pharm*. In Press 2013

ZEITOUNI N C, OSEROFF A R, SHIEH S. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers. Current review and update. *Mol Immunol* 2003; 39(17-18): 1133-6

ZENZEN V, ZANKL H. In vitro evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of the 5-aminolevulinic acid hexylester – mediated photodynamic therapy. *Mutation Research* 2004; 561: 91-100.

ZHANG A Y, OBAGI S. Diagnosis and management of skin resurfacing – related complications. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2009; 21(1): 1-12.

ZHAO C, FAN T, YANG Y, WU M, LI L, ZHOU Z. Preparation, macrophages targeting delivery and anti-inflammatory study of pentapeptide grafted nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm* 2013; 450: 11-20.

ZHENG M, FALKEBORG M, YANG T, XU X. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipid core. *Colloids Surf A, Physicochem Eng Asp* 2013; 430: 76-84.

ZHONG A, ZHANG Y, BIAN Y. Structures and spectroscopic properties of nonperipherally and peripherally substituted metal-free phthalocyanines: functional theory calculations. *J Mol Model* 2010; 29: 470-80.

ZHUANG C-Y, LI N, WANG M, ZHANG X-N, PAN W-S, PENG J-J. Preparation and characterization of vincopecitine for improved oral bioavailability. *Int J Pharm* 2010; 394: 179-85.

ZUR MÜHLEN A, SCHWARS C, MEHNERT W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 45: 149-55.