Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

**Estudos fotofísicos e *in vitro* em modelo animal
do fármaco fotossensibilizador Foscan[®] incorporado em nanoemulsão:
avaliação como sistema de liberação em Terapia Fotodinâmica do
câncer de pele**

Fernando Lucas Primo

**Dissertação apresentada a Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como
parte das exigências para a obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área: Química**

Ribeirão Preto – SP

2006

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

**Estudos fotofísicos e *in vitro* em modelo animal
do fármaco fotossensibilizador Foscan[®] incorporado em nanoemulsão:
avaliação como sistema de liberação em Terapia Fotodinâmica do
câncer de pele**

Fernando Lucas Primo

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

**Dissertação apresentada a Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como
parte das exigências para a obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área: Química**

Ribeirão Preto – SP

2006

*Esta Dissertação é especialmente dedicada
à minha namorada Márcia, que acompanha cada
passo de minha jornada enriquecendo minha vida
com muito amor e carinho. Amo você!*

*Aos meus pais Wilson e Maria
e ao meu irmão Helton
pelos incentivos e apoio constante
em momentos decisivos, pelo amor e carinho.
Sem vocês seria impossível!*

AGRADECIMENTOS

Em especial ao Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco por me acolher em seu grupo de pesquisa, por sua amizade, pelo valioso ensinamento e grandiosa paciência.

Aos professores Prof^ª. Dr^ª. Maria Vitória Bentley, Prof^ª. Dr^ª. Renata Lopez, Prof^ª. Dr^ª. Maria Elisabete Zaniquelli, Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, Prof^ª. Dr^ª. Marilda das Dores Assis e Prof^ª. Dr^ª. Laura T. Okano, pelas sugestões, laboratórios e aparelhos cedidos durante a execução deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de bancada Leandro Michieletto e Marcilene pela imensurável ajuda durante a elaboração de grande parte do trabalho experimental.

Aos amigos do Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia da FFCLRP-USP, Adriana Yoshinaga, Andreza Simioni, Angelo, Alessandra Pelegrino, Carol, Cristina, Daniel, Daniela Manfrim, Daniela Maranhão, Gisele, Jacques, Mariana Guzzo, Patrícia Macaroff e Olímpia pelo grande companheirismo, sendo responsáveis pela agradável e harmoniosa convivência.

Aos amigos Simara Nunes, Vania De Paoli, Jeane, Rozane Turchiello, Anderson e Claire que fizeram parte do laboratório e contribuíram diretamente com preciosos ensinamentos e valorosa amizade.

Ao amigo Ricardo Del Lama pelo companheirismo, amizade e agradável convivência durante o período de elaboração deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP, Henrique Diniz e José Orestes pela amizade e grande ajuda na elaboração dos experimentos *in vitro*.

À FAPESP pela bolsa de mestrado e reserva técnica concedida (Processo #03/11339-7).

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

TFD	Terapia Fotodinâmica
FS	Fotossensibilizador
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta tipo A
UVB	Ultravioleta tipo B
UVC	Ultravioleta tipo C
EROS	Espécies reativas de oxigênio
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
¹O₂	Oxigênio Singlete
³O₂	Oxigênio Molecular
O₂^{-•}	Ânion radical superóxido
OH[•]	Radical hidroxila
DMSO	Dimetil-sulfóxido
hν	Absorção de luz
S	Substrato
S₀	Estado singlete fundamental
S_n	Estado singlete excitado
T₁	Estado triplete excitado
T_n	Estado triplete excitado superior
ISC	Cruzamento intersistemas
IC	Conversão interna

^0F	Fotossensibilizador no estado fundamental
^1F	Fotossensibilizador no estado singlete excitado
^3F	Fotossensibilizador no estado triplete excitado
λ	Comprimento de onda da radiação eletromagnética
ε	Coeficiente de absortividade molar
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivados de hemotoporfirina
Φ_{F}	Rendimento quântico de fluorescência
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singlete
Φ_{T}	Rendimento quântico triplete
Φ_{Ph}	Rendimento quântico de fotobranqueamento
τ_{S}	Tempo de vida de fluorescência
τ_{T}	Tempo de vida triplete
D.O.	Densidade óptica
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
nm	Nanômetros (10^{-9} metros)
PBS	Tampão fosfato salino
J	Fluxo difusional
SD	Desvio médio padrão
EC	Estrato Córneo
ED	Epiderme e derme

<i>m</i>-THPP	meso-tetra(hidroxifenil)porfirina
<i>m</i>-THPC	meso-tetra(hidroxifenil)clorina
<i>m</i>-THPBC	meso-tetra(hidroxifenil)bacterioclorina
O/A	Óleo em água
A/O	Água em óleo
EHL	Equilíbrio hidrófico/lipófilo
NE	Nanoemulsão
NED	Nanoemulsão com dimetil-sulfóxido
DDS	Sistema de liberação de fármaco
Nd-YAG	Neodímio-Ítrio/Argônio
PCS	Espectroscopia de fotocorrelação
<i>n</i>	Índice de refração
<i>I</i>	Intensidade de radiação
<i>Q</i>	Quantidade de fármaco
A	Absorbância
T. L.	Tempo de latência

ÍNDICE

Resumo -----	<i>i</i>
Abstract -----	<i>iii</i>
I – Introdução -----	<i>1</i>
1.1 – Câncer de pele -----	<i>1</i>
1.2 – Terapia Fotodinâmica -----	<i>5</i>
1.3 – Mecanismos de Fotossensibilização -----	<i>6</i>
1.4 – Fármacos fotossensibilizadores utilizados em TFD -----	<i>10</i>
1.5 – Sistemas de liberação de fármacos -----	<i>20</i>
1.6 – Espectroscopia eletrônica no estado estacionário e resolvida no tempo: princípios básicos -----	<i>33</i>
1.6.1 – Espectroscopia de absorção no estado estacionário -----	<i>33</i>
1.6.2 – Espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário -----	<i>35</i>
1.6.3 – Espectroscopia de absorção resolvida no tempo -----	<i>36</i>
1.6.4 – Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo -----	<i>37</i>
II – Objetivos -----	<i>40</i>
III – Parte Experimental -----	<i>41</i>
III.1 – Materiais -----	<i>41</i>
III.2 – Equipamentos -----	<i>42</i>
III.3 – Metodologias -----	<i>48</i>
III.3.1 – Estabilidade e Estudos Fotofísicos -----	<i>48</i>
III.3.1.1 – Preparação das nanoemulsões (NE) através do método de emulsificação por adição direta de fases -----	<i>48</i>
III.3.1.2 – Determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas coloidais e avaliação da estabilidade físico-química a partir da técnica de espalhamento dinâmico de fótons -----	<i>51</i>
III.3.1.3 – Avaliação da influência da concentração de DMSO na estabilidade físico-química das formulações finais: determinação de uma concentração de trabalho -----	<i>53</i>

III.3.1.4 – Caracterização das propriedades fotofísicas no estado estacionário para o Foscan [®] em meio homogêneo e heterogêneo -----	54
III.3.1.5 – Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) em meio homogêneo e heterogêneo -----	54
III.3.1.6 – Medidas de fluorescência resolvida no tempo: determinação do tempo de vida singlete-singlete (τ_s) -----	56
III.3.1.7 – Determinação do espectro de absorção do transiente triplete-triplete a partir de fotólise por pulso laser -----	57
III.3.1.8 – Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_A) -----	58
III. 3.2 – Ensaios “in vitro” -----	59
III.3.2.1 – Obtenção, extração e armazenagem das peles -----	59
III.3.2.2 – Determinação de um método analítico para a quantificação do fármaco por espectroscopia de fluorescência -----	60
III.3.2.3 – Determinação do perfil de permeação cutânea “in vitro” -----	62
III.3.2.4 – Determinação do perfil de retenção cutânea in vitro após 12 horas de aplicação -----	64
III.3.2.5 – Estudos “in vitro” da influência de DMSO na permeação cutânea do Foscan [®] em NE -----	65
III.3.2.6 – Estudos “in vitro” da influência de DMSO na retenção cutânea do Foscan [®] em NE -----	66
IV – Resultados e Discussão -----	67
IV.1 – Avaliação físico-química -----	67
IV.1.1 – Determinação da tamanho médio de partículas para as nanoemulsões na presença e ausência de Foscan [®] -----	67
IV.1.2 – Avaliação da influência do promotor de permeação cutânea, dimetil-sulfóxido (DMSO), na estabilidade físico-química das nanoemulsões -----	70

IV.1.3 – Avaliação da estabilidade físico-química das formulações na ausência e presença de Foscan [®] -----	73
IV.2 – Avaliação Fotofísica -----	75
IV.2.1 – Determinação das propriedades espectroscópicas no estado estacionário para o Foscan [®] em NE e NE+DMSO 0,5 % v/v -----	75
IV.2.2 – Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) para o Foscan [®] em meio orgânico homogêneo e em NE e NE+DMSO 0,5 % v/v -----	78
IV.2.3 – Cinética de decaimento singlete-singlete: determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_F) para o Foscan [®] em meio orgânico homogêneo e em NE e NE+DMSO 0,5 % v/v -----	81
IV.2.4 – Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_A) -----	84
IV.2.5 – Investigação das espécies transientes triplete-triplete e determinação dos tempos de vida (τ_T) gerados através de fotólise por pulso laser para o Foscan [®] nos diferentes meios em estudo -----	88
IV.2.6 – Determinação dos espectros de absorção no UV-vis para as espécies transientes triplete geradas por fotólise por pulso laser para o Foscan [®] nos ambientes químicos em estudo -----	95
IV.3 – Avaliação “in vitro” em modelo animal -----	100
IV.3.1 – Determinação de um método analítico para quantificação do fármaco Foscan [®] nos ensaios in vitro de permeação e retenção cutânea -----	100
IV.3.2 – Determinação do perfil de permeação cutânea do Foscan [®] em NE e NE/DMSO 0,5 % v/v -----	103
IV.3.3 – Determinação do perfil de retenção cutânea dos sistemas Foscan [®] /NE e Foscan [®] /NE/DMSO 0,5 % v/v após 12 horas de aplicação tópica --	107
IV.3.4 – Avaliação da influência da concentração de DMSO na permeação e retenção cutânea do sistema Foscan [®] /NE -----	109
V – Conclusão -----	114
VI – Referências Bibliográficas -----	118

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I	<i>Algumas propriedades fotofísicas da m-THPP, m-THPC e m-THPBC em metanol conforme determinados por Bonnet (23) -----</i>	<i>18</i>
Tabela II	<i>Tamanhos de partículas determinadas por espalhamento dinâmico de fótons -----</i>	<i>69</i>
Tabela III	<i>Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) para o Foscan[®] nos diferentes ambientes químicos estudados -----</i>	<i>80</i>
Tabela IV	<i>Tempos de vida de fluorescência (τ_F) e a amplitude relativa A (proporção de cada componente) para o Foscan[®] nos meio em estudo -</i>	<i>83</i>
Tabela V	<i>Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_A) para cada amostra em estudo -----</i>	<i>86</i>
Tabela VI	<i>Tempos de vida da espécie transiente triplete (τ_T) e amplitude relativa (A) para o fármaco fotossensível Foscan[®] em cada ambiente químico estudado -----</i>	<i>93</i>
Tabela VII	<i>Dados de permeação cutânea “in vitro” para o Foscan[®] determinados após 12 h de aplicação tópica -----</i>	<i>105</i>
Tabela VIII	<i>Coeficientes difusionais de permeação cutânea in vitro para o fármaco em diferentes formulações após 12h de aplicação tópica -----</i>	<i>111</i>

ÍNDICE DE FIGURAS E ESQUEMAS

Figura 1	<i>Parâmetros para diferenciação e identificação dos três tipos de câncer de pele: carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e melanoma -----</i>	3
Figura 2	<i>Esquema ilustrativo da pele demonstrando os componentes e camadas teciduais -----</i>	4
Figura 3	<i>Princípio básico da Terapia Fotodinâmica (TFD) -----</i>	6
Figura 4	<i>Diagrama de Perrin-Jablonski e ilustração das posições espectrais relativas de absorção, fluorescência e fosforescência. S_0 = estado fundamental singlete, S_n = estado excitado singlete, T_1 = estado excitado triplete, ISC = cruzamento intersistemas, IC = conversão interna (processo não radioativo), Φ_F = rendimento quântico fluorescência, Φ_T = rendimento quântico de formação de estado triplete, Φ_Δ = rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Tipo II) -----</i>	7
Figura 5	<i>Estruturas químicas de algumas das principais famílias de fármacos fotossensibilizadores de primeira e segunda geração utilizados em Terapia Fotodinâmica (TFD) -----</i>	15
Figura 6	<i>Estrutura molecular da série dos meso isômeros tetrafenilclorínicos: m-THPP [meso-tetra(hidroxifenil)porfirina], m-THPC [meso-tetra(hidroxifenil)clorina] e m-THPBC [meso-tetra(hidroxifenil)bacterioclorina] -----</i>	17
Figura 7	<i>Ilustração de alguns tipos de sistemas de liberação de fármacos utilizados em TFD -----</i>	22
Figura 8	<i>Vantagens da liberação controlada e sustentada de fármacos: vantagens econômicas e terapêuticas. ■ liberação sustentada, ■ terapia convencional -----</i>	24
Figura 9	<i>Estrutura geral das emulsões (modificado de (44)) -----</i>	27

Figura 10	<i>Distinção entre os estados excitados singlete e triplete para um cromóforo do tipo C=O (sp^2) -----</i>	<i>37</i>
Figura 11	<i>Esquema ilustrativo para os conjuntos de dispositivos ópticos do espectrofluorímetro Fluorolog 3 Spex (Yobin Iyon Inc.). Em azul as nanofendas (slits) = A: nanofenda de excitação, B = nanofenda de emissão 1, e C = nanofenda de emissão 2 -----</i>	<i>44</i>
Figura 12	<i>Representação esquemática do sistema laser Nd-YAG utilizado em fotólise pulsada -----</i>	<i>46</i>
Figura 13	<i>Modelo da célula de difusão de Franz utilizada no experimento de determinação do perfil de permeação cutânea -----</i>	<i>47</i>
Figura 14	<i>Dermatômetro 75 mm da Robbins Instruments, empregado para se uniformizar a espessura das peles utilizadas em todos os ensaios “in vitro” -----</i>	<i>48</i>
Figura 15	<i>Esquema ilustrativo para as etapas de síntese das nanoemulsões (NE) obtidas a partir do método de emulsificação adição direta de fases -----</i>	<i>49</i>
Figura 16	<i>Estrutura química dos surfactantes e óleo utilizado no preparo das NE: (A) Epikuron 170[®], fosfatidilcolina de soja, (B) Poloxamer 188[®], polietileno-polipropileno-glicol e (C) Miglyol 812N[®] (diglicerídio miristato caprílico) -----</i>	<i>50</i>
Figura 17	<i>Estrutura química do dimetil-sulfóxido (DMSO), empregado como promotor de permeação cutânea -----</i>	<i>51</i>
Figura 18	<i>Esquema simplificado ilustrando o sistema de coleta automatizada acoplado às células difusionais -----</i>	<i>62</i>
Figura 19	<i>Avaliação da influência do DMSO na estabilidade físico-química das NE associados ao Foscan[®]. Determinação do tamanho de partículas por espalhamento de fótons em função do tempo coletados ■ 1 dia, ■ 7 dias, ■ 23 dias e ■ 40 dias após o preparo das formulações -----</i>	<i>70</i>

Figura 20	<i>Avaliação da influência do DMSO na estabilidade fotofísica do fármaco fotossensibilizador Foscan[®]. Determinação do tamanho de partículas por espalhamento de fótons em função do tempo: □ 1 dia, ■ 7 dias, ■ 23 dias e ■ 40 dias -----</i>	72
Figura 21	<i>Estudo de estabilidade das NE através do monitoramento do tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de fótons em função do tempo. Amostras: □ NE, ■ NE/DMSO 0,5% v/v, ■ NE/Foscan 1,0 mg/mL e ■ NE/Foscan/DMSO 0,5 % v/v -----</i>	74
Figura 22	<i>Espectros normalizados de absorção (A) e emissão (B) no uv-visível para o Foscan[®] em metanol (—), em NE (—) e NE/DMSO 0,5 % v/v (—). $\lambda_{exc} = 430$ nm, fendas de excitação/emissão ajustadas para 10 nm, 20 nm e 10 nm respectivamente. O inserto mostra o conjunto de bandas Q na região do vermelho entre 600 e 750 nm -----</i>	76
Figura 23	<i>Perfil de decaimento de fluorescência para o Foscan[®] em metanol grau espectroscópico (—), em NE (—), NE/DMSO 0,5 % v/v (—), utilizando como referência a emissão da lâmpada de H_{2(g)} operando a com frequência de 40 kHz e pressão de 0,30 Bar (—) -----</i>	82
Figura 24	<i>Diagrama de orbitais moleculares descrevendo os processos para produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas a partir da transição de energia entre agentes fotossensibilizadores nos estados excitados e o oxigênio molecular -----</i>	85
Figura 25	<i>Decaimento exponencial para o transiente triplete do Foscan[®] em álcool metílico grau espectroscópico. Inserto inferior: desvio padrão calculado dentro das mesmas escalas de decaimento ajustadas em 100 mV e 200 ns -----</i>	89
Figura 26	<i>Decaimento exponencial para o transiente triplete do Foscan[®] encapsulado em NE. Inserto inferior: desvio padrão calculado dentro das mesmas escalas de decaimento ajustadas em 100 mV e 200 ns -----</i>	90

Figura 27	<i>Decaimento exponencial para o transiente triplete do Foscan[®] encapsulado em NE contendo DMSO 0,5% v/v. Inseto inferior: desvio padrão calculado dentro das mesmas escalas de decaimento ajustadas em 100 mV e 200 ns -----</i>	<i>91</i>
Figura 28	<i>Espectro de absorção do transiente triplete-triplete obtido para o Foscan[®] meio orgânico homogêneo após excitação por pulso de laser com comprimento de onda de 355nm. A figura mostra uma absorção máxima em 420 nm e o fotobranqueamento característico em 400 nm e 630 nm. O inseto corresponde ao espectro de absorção do fármaco no UV-visível em mesmo ambiente químico -----</i>	<i>96</i>
Figura 29	<i>Espectro de absorção do transiente triplete-triplete obtido para o Foscan[®] incorporado em NE após excitação por pulso de laser com comprimento de onda de 355nm. A figura mostra uma absorção máxima em 440 nm e o fotobranqueamento característico em 420 nm e 650 nm. O inseto corresponde ao espectro de absorção do fármaco no UV-visível em mesmo ambiente químico -----</i>	<i>97</i>
Figura 30	<i>Espectro de absorção do transiente triplete-triplete obtido para o Foscan[®] incorporado em NE/DMSO após excitação por pulso de laser com comprimento de onda de 355nm. A figura mostra uma absorção máxima em 440 nm e o fotobranqueamento característico em 420 nm e 650 nm. O inseto corresponde ao espectro de absorção do fármaco no UV-visível em mesmo ambiente químico -----</i>	<i>98</i>
Figura 31	<i>Curva padrão de calibração para quantificação do Foscan[®] em álcool metílico grau espectroscópico. Equação: $y = 2748343x + 39147$, $R^2 = 1,00$ -----</i>	<i>102</i>

Figura 32	Curva padrão de calibração para quantificação do Foscan [®] em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, 20 % etanol. Equação: $y = 436226x + 45353$, $R^2 = 0,99$ -----	102
Figura 33	Perfil de permeação cutânea in vitro do Foscan [®] associado em NE (●), em NE/DMSO 0,5 % v/v, (▲), e em solução tampão fosfato pH 7,4 (■). Os resultados representam a média de cinco medidas para cada ponto -----	104
Figura 34	Perfil de retenção cutânea nas camadas da pele para o Foscan [®] nos seguintes meios em estudo: NE (■), NE/DMSO 0,5 % v/v (■) e em solução fisiológica pH 7,4 (■) -----	108
Figura 35	Avaliação da influência da concentração de DMSO na permeação cutânea in vitro do sistema Foscan [®] /NE. Amostras: DMSO 0,5 % v/v (●), DMSO 5,0 % v/v, (▲) e DMSO 10,0 % (■) -----	110
Figura 36	Avaliação da influência da concentração de DMSO na retenção cutânea “in vitro” do sistema Foscan [®] /NE. As amostras foram extraídas do tecido após 12 horas de aplicação tópica. (■) estrato córneo e (■) epiderme+derme -----	112

I – Introdução

I.1 – Câncer de pele

Câncer de pele é o crescimento anormal e descontrolado das células que a compõem. Estas células se dispõem formando camadas e, dependendo da camada afetada, teremos os diferentes tipos de câncer. Os mais comuns são os carcinomas basocelulares e os espinocelulares; o mais perigoso é o melanoma¹.

A radiação ultravioleta (UV) é a principal responsável pelo desenvolvimento do câncer e pelo envelhecimento da pele. Ela está presente diretamente nos raios solares e também em fontes artificiais (cabines de bronzamento) sendo que, nos últimos tempos, sua intensidade na natureza vem sofrendo discreto aumento decorrente de fenômenos climáticos envolvendo os filtros solares atmosféricos. O carcinoma basocelular é o tipo mais freqüente e representa 70% dos casos. É mais comum após os 40 anos, em pessoas de

¹ Sociedade Brasileira de Dermatologia.

pele clara. Seu surgimento está diretamente ligado à exposição solar acumulativa durante a vida. Apesar de não causar metástase, pode destruir os tecidos à sua volta, atingindo até cartilagens e ossos.

Já o carcinoma espinocelular que é o segundo tipo mais comum de câncer de pele, pode se disseminar por meio de gânglios e provocar metástase. Entre suas causas estão: a exposição prolongada ao sol, principalmente sem a proteção adequada; o tabagismo, a exposição a substâncias químicas como o arsênio e alcatrão; e alterações do sistema imunológico.

O melanoma é o tipo mais perigoso, com alto potencial de produzir metástase. Pode levar à morte se não houver diagnóstico e tratamento precoce. É mais freqüente em pessoas de pele clara e sensível e, normalmente, inicia-se com uma pinta escura. Além da proteção solar, é importante fazer uma avaliação clínica da pele para prevenir o desenvolvimento da doença. Os principais indicativos para o desenvolvimento da doença são, entre outros:

- crescimento na pele de uma área (mancha) com aparência elevada e brilhante, translúcida, avermelhada, castanha, rósea ou multicolorida;
- surgimento de pinta preta ou castanha que muda sua cor e textura, tornando-se irregular nas bordas com alterações de tamanho;
- formação de mancha ou ferida que não cicatriza, que continua a crescer apresentando coceira, crostas, erosões ou sangramento.

Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD), os três tipos de câncer de pele (carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e melanoma) podem ser identificados

a partir de alguns aspectos e parâmetros visualmente perceptíveis, tais como tipo de assimetria, bordas, cor e dimensão, os quais são comparados na Figura 1 a seguir.

Figura 1 – Parâmetros para diferenciação e identificação dos três tipos de câncer de pele: carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular e melanoma.²

²Fonte: Sociedade Brasileira de Dermatologia.

A radiação eletromagnética solar inclui desde os raios cósmicos até a radiação infravermelha, passando pelo ultravioleta (UV) e visível (1). A radiação UV se divide em UVC (200 a 290 nm), UVB (290 a 320 nm) e UVA (320 a 400 nm).

As radiações com comprimento de onda abaixo de 290 nm — como os raios cósmicos, os raios-x e os UVC — não atingem a superfície terrestre, pois são “filtrados” pelas camadas gasosas presentes na atmosfera terrestre. Uma análise total da radiação incidente que penetra no planeta indica que temos em sua composição raios UVA e UVB (5%), radiação visível (40%) e radiação infravermelha (55%), determinados ao nível do mar.

A radiação ultravioleta (UVA/UVB) possui maior penetração pelos tecidos, penetrando diretamente até camadas internas como a derme (Figura 2).

Figura 2 – Esquema ilustrativo da pele demonstrando os componentes e camadas teciduais³.

No verão, temos uma maior incidência da radiação UVB, que, apesar de estar presente em menor proporção, é a principal causadora das queimaduras solares, as quais

³Fonte: <http://kidshealth.org/kid/body/> - Nemours Center for Children's Health Media

são consideradas as principais responsáveis pelas alterações celulares que podem conduzir ao desenvolvimento do câncer de pele, sendo portanto considerada radiação carcinogênica.

Os raios UVA são os maiores constituintes da radiação UV. Por possuírem menor frequência, tais radiações penetram mais profundamente na pele, até atingirem as camadas mais profundas do tecido. Seu efeito melanogênico é intenso, responsável pelo escurecimento da pele e induz frequentemente a reações de fotossensibilidade, sendo também responsável pelo aparecimento de erupções cutâneas, um tipo de anomalia precursora do câncer.

I.2 – Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que vem atuar no tratamento de diversos tipos de câncer (2-4), e conta com interesse crescente nas últimas décadas (5-7). Atuando de forma pouco invasiva e complementar às terapias tradicionais, a TFD consiste basicamente na administração sistêmica ou tópica de um fármaco fotossensibilizador (FS) seguido pela exposição da lesão à luz visível, resultando na regressão tumoral caracterizada por processos de morte celular (8;9) (Figura 3), sendo que, o fármaco fotossensibilizador e a radiação luminosa separadamente não induzem nenhum tipo de dano aos tecidos. A radiação monocromática utilizada na maioria dos casos é do tipo LASER que é direcionada sobre a lesão por um conjunto de fibras ópticas. A maioria dos estudos até o presente momento sugerem um mecanismo comum de ação para a TFD (8). Após a excitação do fotossensibilizador para os estados excitados *singlete* e *triplete*,

seguida por transferência de energia para o oxigênio molecular (O_2), leva-se a morte tumoral ocasionada por espécies reativas de oxigênio definidas como EROS (1O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}OH$, H_2O_2), além de outras formas radicalares ($CH_3^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$, $R-CO_2^{\bullet}$, etc.) que atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares, desencadeando a morte de tais tecidos por processos de necrose e/ou apoptose celular (5;10;11). Os ácidos nucleicos, as enzimas e as membranas celulares são rapidamente atacados pelos EROS gerados, levando a liberação de uma variedade de produtos altamente reativos que atuam de forma a induzir processos foto-oxidativos por transferência de elétrons e/ou abstração de hidrogênio.

Figura 3 - Princípio básico da Terapia Fotodinâmica (TFD)⁴.

I.3 – Mecanismos de Fotossensibilização

A interação de luz com o fármaco fotossensibilizador em TFD induz a uma série de processos fotofísicos e fotoquímicos em níveis eletrônicos, decorrente da interação da

⁴Fonte: <http://www.bmb.leeds.ac.uk/pdt/index.html> - Yorkshire Cancer Research – University of Leeds – Leeds - Inglaterra

radiação eletromagnética com a matéria. Tais processos são detalhadamente ilustrados no diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 4).

Figura 4 - Diagrama de Perrin-Jablonski e ilustração das posições espectrais relativas de absorção, fluorescência e fosforescência. S_0 = estado fundamental singlete, S_n = estado excitado singlete, T_1 = estado excitado tripleto, ISC = cruzamento intersistemas, IC = conversão interna (processo não radiativo), Φ_F = rendimento quântico fluorescência, Φ_T = rendimento quântico de formação de estado tripleto, Φ_Δ = rendimento quântico de produção de oxigênio singleto (Tipo II)⁵.

Após a absorção de um fóton de luz, o fármaco fotossensibilizador passa a popular um estado eletrônico excitado singlete mais energético (S_n), podendo retornar ao seu estado fundamental (S_0) por processo de relaxação física conhecido como conversão interna ou

⁵Fonte: Bernard Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley Editora, v.1, 2001.

através de processos radiativos de emissão de fluorescência e/ou fosforescência. As propriedades fluorescentes dos FS são úteis para a visualização, localização e delineação de lesões malignas, favorecendo a utilização de diversas técnicas espectroscópicas modernas na obtenção de diagnósticos por imagem, entre outras.

Uma alta população do estado excitado singlete dos fotossensibilizadores pode dar origem ao estado excitado *triplete*, uma conformação eletrônica com energia ligeiramente mais baixa que o estado excitado singlete e com tempo de vida mais longo (μs à ms), e caracterizado pela conversão direta do sentido do spin eletrônico do estado excitado ($\uparrow - \downarrow$). A ação fotodinâmica é dependente do processo de cruzamento intersistemas, responsável pela formação do estado energético triplete. Os fármacos fotossensíveis mais eficientes em TFD devem possuir necessariamente um alto rendimento quântico de conversão para o estado eletrônico excitado triplete e além disso tempos de vida triplete mais longos. A partir do estado excitado triplete, o FS pode retornar diretamente ao estado fundamental pelo processo de conversão interna ou através do processo radiativo de emissão de fosforescência (1).

O fármaco fotossensibilizador no estado excitado triplete pode então desencadear interações fotoquímicas, elucidadas basicamente por dois mecanismos distintos (8).

O mecanismo do Tipo I envolve a abstração de um átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no estado excitado triplete e diferentes macromoléculas biológicas, levando à formação de radicais livres e/ou íons radicais. Poucos materiais biológicos apresentam facilidade de fotoredução (por exemplo, quinonas e citoquinonas) em processos nos quais temos a oxidação do fotossensibilizador a cátion radical- π e o substrato reduzido. As espécies reduzidas podem transferir um elétron

ao oxigênio molecular presente no meio (em sua forma triplete), formando espécies reativas de oxigênio como peróxidos de hidrogênio, ânion superóxidos, etc. Este tipo de fotossensibilização é conhecido como sendo do Tipo I, sendo esquematizada a seguir.

Mecanismo de fotossensibilização do Tipo I – Reações redox com biomoléculas

Sendo F = fármaco fotossensibilizador e S = substrato biológico

Outro mecanismo possível para fotossensibilização é a transferência de energia para o oxigênio molecular a partir da configuração eletrônica triplete do FS, induzindo a formação do oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$). O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa que interage de forma a oxidar vários substratos biológicos capacidade esta resultado da sua interação por difusão molecular. Acredita-se que o oxigênio singlete seja o principal mediador dos danos fotodinâmicos nos sistemas biológicos, pois reage rápida e indiscriminadamente com os mais variados materiais biológicos eletrofílicos, como lipídeos insaturados, proteínas, ácidos, etc., sendo apontado como o principal responsável pela inativação celular tumoral. Este tipo de fotossensibilização é conhecido como do Tipo II, sendo esquematizado a seguir.

Mecanismo de fotossensibilização do Tipo II – Mediado pela produção de $^1\text{O}_2$, como exemplo a peroxidação lipídica.

Sendo F = fármaco fotossensibilizador e S = substrato biológico

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) gerado pela reação do Tipo II é extremamente importante para o sucesso da TFD. Acredita-se que seja um intermediário chave em muitos processos oxidativos fotoinduzidos em sistemas químicos ou biológicos, tendo sido considerado a principal espécie citotóxica, responsável pela inativação celular (12) embora recentemente tenha sido mostrado que os mecanismos Tipo I e II provavelmente atuem em harmonia na maioria dos casos.

I.4 – Fármacos fotossensibilizadores utilizados em TFD

A aplicação de agentes fotossensibilizadores em tratamento de doenças data cerca de 4000 anos atrás, quando os antigos egípcios usavam a combinação de plantas (ingeridas oralmente contendo substâncias conhecidas como *psolares*) e da luz solar, como um tratamento de sucesso para o vitiligo e outras doenças da pele (6). Entretanto, nos tempos modernos, os estudos iniciais aplicados à TFD surgiram no início do século XX, quando

Fisen, em 1890, tratou um caso de “*lupus vulgaris*”, uma condição tubercular da pele, utilizando uma combinação de eosina e luz (13). Posteriormente, em 1903, Trappeiner tratou um câncer de pele com uso tópico de eosina e luz. Contudo, o efeito fotodinâmico em humanos, ocorrido com a administração sistêmica de um fotossensibilizador, foi primeiramente observado em 1913 por Meyer-Betz, depois de injetar em si mesmo 200 mg de hematoporfirina (Hp). A subsequente exposição de pequenas regiões do corpo à luz visível resultou em severas reações locais, com presença de inchaços extremos e queimaduras. Essa fotossensibilização cutânea permaneceu por vários meses (14).

O grande avanço da TFD teve início com a descoberta da primeira geração de fotossensibilizadores derivados da hematoporfirina (HpD), junto com suas variantes comerciais denominadas Fotofrin[®], Fotosan[®], Fotogen[®] e Fotocarcinorin[®] (2). Embora estes fármacos fotossensíveis tenham sido extensivamente utilizados em estudos clínicos experimentais, eles apresentam três grandes desvantagens, como:

=> baixa seletividade com respeito à incorporação e retenção por células tumorais versus células normais, causando fotossensibilidade na pele por algumas semanas (cerca de 8 a 10 semanas);

=> exibem propriedades espectrais deficientes, uma vez que a banda referente à maior absorção de luz na região do vermelho do espectro visível (600 a 800 nm) é fraca. Esta é a região espectral de maior penetração de luz nos tecidos uma vez que os componentes endógenos de sistemas biológicos (por exemplo, grupo heme/hemoglobina) possuem alta absorção em regiões espectrais acima de 600 nm. Dentro da região do infra-vermelho temos a influência direta dos processos vibracionais da água e a produção de calor.

=> os HpD são misturas complexas de compostos variados, sendo de difícil purificação e isolamento de um único princípio ativo. A complexidade das misturas provém tanto da posição isomérica do composto como também de sua estereoisomeria.

Com o desenvolvimento da TFD, surgiu a necessidade de busca por novos fotossensibilizadores que seriam mais eficientes que os derivados de hematoporfirina, já anteriormente citados (15).

Dentre algumas propriedades que foram identificadas como sendo necessárias para um fármaco fotossensibilizador ser um eficientemente ativo em TFD destacam-se:

1.4.a – Propriedades físico-químicas

i) Estabilidade termodinâmica com alta pureza química e composição constante ao longo de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

ii) Coeficiente de extinção molar adequado dentro da região do vermelho ou infravermelho próximo do espectro eletromagnético (600 – 800 nm), denominada *janela “terapêutica”*, usualmente com alta taxa de penetração tecidual.

iii) Possuir baixa tendência de se agregar em meio aquoso, uma vez que a formação de espécies *diméricas* afeta diretamente as propriedades espectroscópicas do fármaco no estado fundamental e no estado excitado.

1.4.b – Propriedades fotofísicas

i) Possuir alta estabilidade fotoquímica, evitando processos de fotodegradação e/ou fotobranqueamento rápidos que influenciam diretamente no potencial fotodinâmico do fármaco.

ii) Deve possuir alto rendimento quântico de produção dos estados eletrônicos excitados *triplete* com tempos de vida longos e suficientemente energéticos para induzir a produção de *oxigênio singlete* e outras espécies reativas de oxigênio (EROS) ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}^{\bullet}$).

1.4.c – Propriedades farmacológicas

i) Possuir seletividade para diferentes tipos de tumores, sendo especialmente específico para neoplasias.

ii) Deve ter incorporação preferencial no tecidos tumorais em relação aos tecidos normais, induzindo apenas toxicidade limitada no material biológico vizinho saudável.

iii) Apresentar uma liberação rápida no organismo, exibindo baixa biotoxicidade sistêmica e/ou tópica, minimizando assim os efeitos colaterais fototóxicos do fármaco.

1.4.d – Propriedades fototerapêuticas

i) Provocar morte celular eficiente e preferencial a neoplasias.

ii) Fotossensibilidade cutânea minimizada, pela eliminação rápida da pele.

iii) Ausência de potencial mutagênico.

iv) Apresentar uma alta eficiência fotodinâmica na destruição do tecido tumoral sob ação de baixos níveis de luz visível.

Embora praticamente nenhum fármaco fotossensibilizador possa realmente preencher todos estes requisitos, inúmeros compostos têm sido investigados e superando as limitações dos fármacos de primeira geração.

Assim, anos de trabalho levaram ao desenvolvimento da segunda geração de agentes fotossensibilizadores. Entre os FS mais promissores da segunda geração podemos destacar alguns potencialmente ativos como as clorinas, as bacterioclorinas e as ftalocianinas (metaladas ou não) com estruturas químicas características ilustradas na Figura 5. (9;16-20).

Porfirinas
(1ª geração)

Ftalocianinas
(2ª geração)

Clorinas
(2ª geração)

Bacterioclórinas
(2ª geração)

Figura 5 – Estruturas químicas de algumas das principais famílias de fármacos fotossensibilizadores de primeira e segunda geração utilizados em Terapia Fotodinâmica (TFD).

As clorinas são pigmentos verdes encontrados na natureza, tais como a clorofila-a, que está envolvida na fotossíntese de plantas, possuindo uma saturação parcial em um dos quatro anéis pirrólicos. As clorinas exibem um alto coeficiente de absortividade molar na região espectral do vermelho, sendo maior em magnitude comparando-se com compostos porfirínicos (21).

As ftalocianinas foram consideradas excelentes fármacos fotossensibilizadores para a TFD devido à sua grande estabilidade e pureza química. Possuem muitas vantagens comparando-se aos FS de primeira geração pelo fato de possuírem uma alta absorção de luz ($\epsilon_{670} \approx 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) nos comprimentos de onda de 600 a 800 nm, exatamente na janela terapêutica da TFD, além de baixa toxicidade *in vitro*. Suas propriedades fotofísicas são fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon metálico central, o que é refletido diretamente no rendimento quântico e tempo de vida de estado excitado tripleto (Φ_T , τ_T).

O fármaco fotossensível escolhido neste trabalho de pesquisa teve suas propriedades fotofísicas determinadas no fim da década de 80, pelo grupo de pesquisa do prof. Dr. Raymond Bonnett (Queen Mary and Westfield College, Londres, Inglaterra) precursor da síntese de uma série de compostos, denominas tetrafenilclorinas (Figura 6), dando início a uma seqüência de estudos fotofísicos e fotoquímicos que levaram a elucidação do potencial fotodinâmico em meio orgânico homogêneo.

Figura 6: Estrutura molecular da série dos meso isômeros tetrafenilclorínicos: *m*-THPP [*meso*-tetra(hidroxifenil)porfirina], *m*-THPC [*meso*-tetra(hidroxifenil)clorina] e *m*-THPBC [*meso*-tetra(hidroxifenil)bacterioclorina].

A síntese desta série de meso isômeros partiu de um precursor porfirínico, um composto fotossensibilizador de primeira geração. Estes fármacos foram obtidos a partir da redução do anel central tetrapirrólico porfirínico, seguido da adição de grupamentos polihidroxí terminais. As modificações estruturais resultaram em produtos com propriedades fotofísicas muito importantes (Tabela I) que vieram proporcionar características excelentes para aplicação em Terapia Fotodinâmica nas mais diferentes modalidades clínicas (22).

Tabela I: Algumas propriedades fotofísicas da *m*-THPP, *m*-THPC e *m*-THPBC em metanol conforme determinados por Bonnet (23).

	<i>m</i> -THPP	<i>m</i> -THPC	<i>m</i> -THPBC
$\lambda_{\max}$ absorção / nm	644	650	735
$\epsilon_{\max}$ / M ⁻¹ cm ⁻¹	3400	29600	91000
$\lambda_{\max}$ fluorescência/ nm	649; 715	653; 720	612; 653;746
λ excitação / nm	415	415	500
Φ_f	0.12	0.089	0.11
Φ_T	0.69	0.89	0.83
τ_T / s	1.2x10 ⁻⁴	0.50x10 ⁻⁴	0.53x10 ⁻⁴
O ₂ constante de supressão k _q / M ⁻¹ s ⁻¹	1.9x10 ⁹	1.8x10 ⁹	2.5x10 ⁹
Φ_{Δ} saturado c/ ar	0.46	0.43	0.43
Φ_{Δ} saturado com O ₂ (g)	0.56	0.59	0.62

Neste trabalho de pesquisa foram avaliados algumas propriedades espectroscópicas da *meso*-tetra(hidroxifenil)clorina, *m*-THPC, veiculada em NE. Este fármaco é uma clorina de segunda geração, com grupamentos fenólicos terminais e uma insaturação a menos no anel central. Estas características lhe conferiram propriedades fotoquímicas e fotofísicas muito interessantes, as quais favoreceram o desenvolvimento de inúmeros trabalhos científicos durante as últimas décadas. Industrialmente produzida pela Scotia Pharmaceuticals (Stirling, Inglaterra), é denominada comercialmente Foscan[®] ou Temoporfin[®], dependendo do país em que é comercializada, atingindo rapidamente status em fase clínica na Europa. Este fármaco vem sendo amplamente utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer, principalmente com enfoque para TFD de mesotelioma humano, tumores de esôfago, cabeça e pescoço (24).

Os grupamentos hidroxí terminais dos substituintes fenólicos, bem como os nitrogênios pirrólicos dos anéis centrais, permitem que a molécula exista na forma de diferentes espécies iônicas com cargas diferentes, dependendo do pH e do ambiente químico. Além disso, um certo caráter anfífilo está presente neste composto, sendo parcialmente solúvel em ambiente polar, com alto potencial lipofílico.

O espectro de absorção do Foscan[®] é caracterizado por uma forte banda Soret (em aproximadamente 415 nm) e um conjunto de bandas Q na região de 500 a 670 nm do espectro visível, com absorção máxima exatamente em 650 nm (em meio orgânico homogêneo) (22;23).

Estudos fotofísicos evidenciam que o Foscan[®] possui um rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{ph}) da ordem de $9,0 \times 10^{-4}$ em solução PBS suplementada com 2 % v/v de soro albumina bovina (BSA), como demonstrado por Angotti e Belitchenko (25). Estes dados sugerem uma alta estabilidade fotofísica para o composto em meio biológico, porém deve-se considerar a existência de espécies fotooxidadas que atuam como subprodutos provenientes do fenômeno de fotobranqueamento. Estes compostos foram determinados por Hadjur (26) sendo identificados espectrofotometricamente, e localizados fora da região visível do espectro eletromagnético. Sua presença foi justificada através de um conjunto de bandas de absorção no ultravioleta, aproximadamente em 320 nm, correspondendo a 10 % de uma solução de *m*-THPC em metanol/água 3:2.

Dentre os novos compostos de segunda geração, o Foscan[®] foi considerado o fármaco fotossensibilizador mais potente atualmente em fase clínica, possuindo um potencial fotodinâmico aproximadamente cem vezes maior que os derivados

hematoporfirínicos (HpD) (24). Geralmente é ativado em 652 nm, comprimento de onda de maior absorção e por sua vez de melhor penetração tecidual, podendo varrer uma profundidade de aproximadamente 1 cm pelas camadas cutâneas (27;28). A razão de redução tumoral é de 20:1 comparando-se com outros fármacos de segunda geração (24).

Embora novos fotossensibilizadores com propriedades de localização específicas estejam sendo desenvolvidos (9;17) a maioria dos fármacos fotossensíveis por si só não apresenta uma grande afinidade preferencial e/ou seletiva pelos tecidos tumorais. A baixa seletividade dos FS pelas neoplasias permanece sendo a grande desvantagem para sua aplicação direta em TFD.

Em soluções homogêneas, a probabilidade e a eficiência do processo de fotossensibilização dependem de vários parâmetros fotofísicos, tais como o rendimento quântico do estado excitado triplete (Φ_T) e sua cinética de decaimento (τ_T). Contudo, em meio micro-heterogêneo tais como sistemas biológicos — por exemplo, células e tecidos — os parâmetros estruturais e funcionais também estão envolvidos na determinação da eficiência do processo de fotossensibilização. Estes parâmetros regulam a incorporação, localização e a ligação/interação das moléculas do fármaco com as do tecido alvo.

I.5 – Sistemas de liberação de fármacos

A eficiência da TFD está diretamente relacionada com a capacidade do fármaco fotossensibilizador de se acumular seletivamente nos tecidos tumorais (5;10;29;30). Nas últimas décadas a tecnologia farmacêutica tem em muito contribuído para o

desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (DDS – drug delivery systems) fotossensíveis em TFD (5;7;18;19). Vários tipos de sistemas de liberação tem sido estudados associando-se o FS para aplicação sistêmica e/ou tópica em diversas modalidades terapêuticas de câncer.

Os DDS possuem capacidades físico-químicas muito importantes que podem levar a uma especificidade alvo-tumoral extremamente otimizada, minimizando diversas limitações pertinentes à administração do FS por si só. A interação biológica de fármacos está diretamente relacionada com a afinidade química pelos sistemas de liberação, o que levou ao desenvolvimento de veículos com maior potencial biológico favorecendo o *up-take* tumoral associado a uma farmacocinética adequada, minimizando ao máximo os efeitos colaterais, usualmente presentes e que limitam a utilização da TFD.

O emprego da tecnologia farmacêutica proporciona vantagens relacionadas ao transporte eficiente de FS, ocasionando uma maior penetração tumoral, liberação controlada, biocompatibilidade, redução de fototoxicidade, etc.

Vários tipos de DDS têm sido estudados e projetados para aplicação em TFD, como as vesículas lipossomais (18;19), micropartículas (16), microemulsões (31;32) proteínas de baixa densidade (7;18), sistemas dendriméricos (33;34) (Figura 7), entre outros, com propriedades físico-químicas e biológicas de interesse resultando assim em diversos trabalhos na literatura científica mundial (35-37).

Figura 7 – Ilustração de alguns tipos de sistemas de liberação de fármacos utilizados em TFD.

Com a explosão da nanotecnologia, consolidada desde início da década de 90 no Brasil, vários ramos da ciência foram beneficiados com a expansão de tecnologias até então não incorporados pela comunidade científica (33;37-42).

A busca por DDS nanoestruturados foi então amplamente estudada levando ao desenvolvimento de novos *designs* na morfologia dos sistemas convencionais, resultando assim em inúmeras vantagens comparando-se aos sistemas clássicos.

Os aspectos que combinam pesquisas nas áreas de "nanotecnologia" e "biomedicina" resultaram na chamada "nanobiotecnologia" que envolve áreas como a genômica, robótica, associadas na descoberta de novas drogas e processos químicos (34;36;37;39).

Sistemas de liberação controlada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos. Nas formas de administração convencionais (nebulização "spray", injeção, pílulas) a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Uma vez que cada droga possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e o de liberação controlada e sustentada, pode ser melhor compreendido analisando-se a Figura 8 a seguir.

Figura 8 – Vantagens da liberação controlada e sustentada de fármacos: vantagens econômicas e terapêuticas. — liberação sustentada, — terapia convencional⁶.

Do ponto de vista do tratamento clínico, o controle da concentração terapêutica é importante. Como exemplo podemos citar a administração de analgésicos em pacientes com câncer terminal. Nos casos em que a concentração da droga estiver abaixo da concentração terapêutica, o paciente experimentará dor. Trabalhos recentes envolvendo liberação controlada têm fornecido inúmeras evidências que justificam sua eficiência terapêutica, além de muitas vezes estar aliada a vantagens econômicas. Dentre vários resultados podemos evidenciar: o aumento na eficácia das terapias com liberação progressiva e controlada do fármaco a partir da degradação da matriz e maior tempo de permanência na circulação; diminuição significativa da toxicidade; natureza e composição dos veículos amplamente variada, observando o contrário do que se poderia esperar, pois não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco

⁶Fonte: Rede Nacional de Nanobiotecnologia (modificado)

(degradação biológica p. ex. enzimas, pH e outros). Tais características, portanto, conduzem a uma administração segura (sem causar reações inflamatórias locais, etc.) e maior conveniência ao paciente (menor número de doses). A possibilidade de direcionamento a alvos específicos surge como mais uma vantagem fundamental que vem atraindo o interesse de aplicação em várias modalidades terapêuticas. A capacidade de associação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas é a uma das principais razões que motivaram o início do desenvolvimento científico desta área da ciência ainda tão pouco explorada.

O termo nanopartículas aplicado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se a vários tipos de estruturas diferentes como nanoesferas, nanocápsulas e nanocolóides.

Neste trabalho de pesquisa avaliamos a interação do fotossensibilizador Foscan[®] (que vem sendo muito estudado e utilizado em diversos países europeus em TFD fase clínica) associado a emulsões nanoestruturadas (nanoemulsões — NE), do tipo óleo em água (O/A), para aplicação tópica em protocolos terapêuticos visando tratamento do câncer de pele.

I.5.a – Nanoemulsões (NE)

A interação de fármacos com a interface de agregados supramoleculares de compostos anfífilicos ou de polímeros representa um aspecto importante dentro da tecnologia farmacêutica, devido suas implicações biológicas da presença destes compostos

em formulações interferindo diretamente no perfil de biodisponibilidade, o que resulta na alteração das constantes de ionização dos fármacos cujos efeitos terapêuticos dependem substancialmente da fração ionizada do mesmo, modificando drasticamente a estabilidade de um grande número de compostos de uso terapêutico (43).

As microemulsões (ME) ou nanoemulsões (NE) são sistemas coloidais, nos quais a fase interna constitui um microambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades, atuando como agregados esféricos e com diâmetros menores que 1000 nm (44). As NE são, de forma geral, definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, de dois líquidos imiscíveis, (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água.

As ME foram introduzidas na literatura por Hoar e Shulman (45) em 1943, ao descreverem sistemas transparentes formados espontaneamente quando óleo e água eram misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico misturado a um álcool de cadeia alquílica média de aproximadamente dez carbonos. Entretanto, o termo microemulsão foi utilizado somente no final da década de 1950 por Schulman e colaboradores (46).

Do ponto de vista farmacêutico, as nanoemulsões podem ser definidas como emulsões, na maioria das vezes transparentes, nas quais um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável (Figura 9).

Figura 9 – Estrutura geral das emulsões (modificado de (44)).

A formação da NE geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como, tensoativo, fase aquosa, fase oleosa e, quando necessário, o co-tensoativo, sendo que a orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo, traduzidas principalmente pelo seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo (EHL). A principal característica do sistema é formar espontaneamente a fase interna por homogeneização suave dos componentes da fórmula. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, podendo ser utilizada por um tempo muito mais longo de estocagem.

Considerando que as NE O/A são formadas por gotículas de óleo dispersas em água, contendo o tensoativo na interface óleo/água, estas possuem ótima capacidade de solubilização de substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas que têm sido utilizadas para aumentar a estabilidade, a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos, pois permitem a incorporação de vários tipos de compostos na fase interna oleosa (baixa constante dielétrica), na região interfacial (constante dielétrica intermediária entre o óleo e água) ou na fase externa aquosa (alta constante dielétrica) (44).

Para explicar melhor a formação das NE, partimos do pressuposto que quando dois líquidos imiscíveis são misturados, mantendo-se agitação constante, as duas fases tendem, inicialmente, a formar gotículas dispersas de um dos líquidos no interior do outro. Quando a agitação cessa, as gotículas tendem a coalescer e os líquidos separam-se novamente. Podemos, então, definir o tempo de vida de uma emulsão, como o tempo decorrido desde o momento em que os líquidos estão completamente homogeneizados, até a separação total do sistema. Assim, o tempo de vida da NE é maior quanto melhor for a estabilidade do sistema. Portanto, os motivos que levam a esta desestabilização da emulsão são o ponto primordial para a compreensão da sua teoria de formação.

Quando um dos líquidos dividi-se no interior do outro se forma uma fase interna, dispersa ou contínua. Assim, o processo de emulsificação implica num grande aumento da área interfacial, a qual leva a um aumento brusco da energia livre de superfície. Este fenômeno, em condições de temperatura constante, pode ser descrito pela equação (1):

$$\Delta G = G_2 - G_1 = \gamma_i \times \Delta S \quad (1)$$

sendo ΔG a variação na energia livre de superfície, γ_i a tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa, ΔS variação na área interfacial.

Através desta equação (1), pode-se verificar que o caminho mais viável para a estabilização do sistema é a diminuição da tensão interfacial da dispersão, como forma de reduzir a energia livre derivada da expansão da área interfacial. É possível verificar, também, que a estabilidade da emulsão deverá ser maior quanto menor for a energia livre remanescente da expansão da área interfacial, tendendo a um sistema termodinamicamente

estável, caso o aumento da energia livre seja totalmente compensado pela diminuição da tensão superficial.

Neste aspecto, os agentes tensoativos, com propriedades de diminuir a tensão interfacial entre o óleo e água, encontram seu papel fundamental na estabilização de emulsões, microemulsões e nanoemulsões. As emulsões comuns são consideradas sistemas termodinamicamente instáveis, sendo que o desenvolvimento tecnológico tende a intervir de forma direta a retardar da melhor maneira possível e pelo maior tempo o processo de separação de fases. Já as NE geralmente são formuladas com presença de co-tensoativo, cuja função é diminuir a tensão superficial para valores abaixo dos limites proporcionados pelos agentes emulsificantes comuns.

Assim, em proporções adequadas de seus componentes e em condições de temperatura, pressão e força iônica constantes, o sistema forma-se espontaneamente quando a energia remanescente da interface está próxima de zero ($\Delta G \rightarrow 0$).

Portanto, o desenvolvimento e estudo de nanoemulsões empregadas como sistemas de liberação de fármacos (DDS) são de amplo interesse dentro do contexto farmacêutico. Tais sistemas possuem um conjunto de vantagens físico-químicas que lhe conferem status de promissores veículos de liberação de fármacos, justificando assim sua aplicação em diversas modalidades terapêuticas, sendo avaliadas neste trabalho de pesquisa com enfoque científico para posterior aplicação clínica em Terapia Fotodinâmica de câncer de pele.

I.5.b – Promotores de permeação cutânea

A pele humana atua como uma eficiente barreira biológica designada para atuar diretamente como uma “camada externa” de proteção para todo o organismo. Esta barreira possui propriedades que ocasionam dificuldades para penetração de agentes terapêuticos aplicados transdermicamente. Algumas substâncias químicas têm sido estudadas e utilizadas com frequência como agentes promotores de permeação cutânea para fármacos aplicados topicamente e/ou transdermicamente, os quais interagem diretamente com os constituintes da pele, aumentando o fluxo dos fármacos pelos tecidos.

Vários compostos têm sido avaliados como promotores de permeação cutânea (ou promotores de absorção cutânea), porém existem certas limitações quanto ao emprego dessas substâncias, uma vez que os mecanismos de atuação destes aditivos ainda não foram claramente definidos.

Muitos compostos químicos têm sido estudados como promotores de permeação em testes *in vitro* com pele humana ou animal. Entretanto nenhum deles se comporta como um modelo ideal.

Dentre as propriedades químicas mais desejáveis para um promotor de permeação cutânea, podemos destacar como principais:

- não apresentar toxicidade ou irritabilidade à pele;
- atuação rápida como efeito previsível e de forma reprodutível;
- não possuir nenhuma atividade farmacêutica, ou seja, não possuir nenhum tipo de receptor ou sítio de ligação específico no organismo;

- quando removido ou eliminado da pele, favorecer o rápido restabelecimento das propriedades estruturais dos tecidos e funcionalidade normal do órgão;
- possuir compatibilidade apropriada com os componentes da formulação inclusive com o fármaco,
- ser cosmeticamente aceitável.

Os promotores de permeação podem ser incorporados nas formulações para promover o aumento do fluxo de fármaco através de diversas membranas incluindo o epitélio gástrico ou nasal. A processo de difusão pela pele é rigidamente controlado pela camada mais externa, o estrato córneo, considerada uma membrana passiva. O fluxo de estado estacionário (J) do fármaco através da pele pode ser aproximadamente determinado pela segunda lei de Fick para processos difusionais (Equação 2):

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad (2)$$

sendo C a concentração da substância em difusão, x o espaço percorrido (secção), D o coeficiente de difusão e t o tempo.

Para os protocolos de permeação *in vitro*, geralmente são utilizados sistemas em que a formulação contendo o fármaco (solução doadora) é aplicada topicamente na membrana (pele) sendo coletado numa solução fisiológica (solução receptora). Nestas condições *in vitro* a equação 2 pode ser simplificada para:

$$\frac{d m}{d t} = \frac{D C_0}{h} \quad (3)$$

sendo m a massa acumulativa do permeante por unidade de área da membrana (pele) no tempo t , C_0 é a concentração de difusão na primeira camada e h a espessura da membrana.

Porém em muitos protocolos a medida de C_0 é de difícil obtenção. Porém a concentração na solução receptora é geralmente conhecida (C_0^*), sendo relatada como:

$$C_0 = P C_0^* \quad (4)$$

sendo P o do coeficiente de partição da substância em difusão entre a membrana e a solução receptora. Substituindo a equação (4) em (3), temos:

$$\frac{d m}{d t} = \frac{D P C_0^*}{h} \quad (5)$$

A equação 5 é a relação clássica utilizada para análise dos dados em experimentos de permeação, podendo-se calcular o fluxo difusional (dm/dt) que é governado pelo coeficiente de difusão do fármaco pelo estrato córneo, pela concentração do princípio ativo no veículo, pelo coeficiente de partição entre a formulação e o estrato córneo e pela espessura da pele.

A literatura apresenta muitas substâncias que podem atuar como promotores de permeação cutânea, como a própria água, alguns solventes apróticos como os sulfóxidos (DMSO — dimetil-sulfóxido, DMA — dimetil-acetamida, DMF — dimetil-formamida), as pirrolidonas (*N*-metil-2-pirrolidona e a 2-pirrolidona), os ácidos graxos (saturados, *trans*-insaturados e *cis*-insaturados), surfactantes (lauril sulfado de sódio, brometo de cetiltrimetil

amônio, dodecil betaína, Tween 80), os óleos essenciais (terpenos e terpenóides), a uréia, os fosfolipídios entre outros (47;48).

Neste trabalho de pesquisa, realizamos alguns testes utilizando como promotor de permeação/absorção o dimetil-sulfóxido (DMSO) variando-se sua concentração na formulação empregada nos ensaios espectroscópicos e *in vitro*.

As faixas de concentrações de trabalho não superam 1 % (v/v) para os testes de estabilidade morfológica das NE, esperando-se, assim, não ativar seu potencial citotóxico, mas sim explorar suas propriedades como promotor de permeação.

I.6 – Espectroscopia eletrônica no estado estacionário e resolvida no tempo: princípios básicos

I.6.1 – Espectroscopia de absorção no estado estacionário

A interação da radiação eletromagnética com a matéria resulta em uma série de diferentes fenômenos evidenciados por processos fotofísicos, fotoquímicos e outros não radiativos que muitas vezes podem ser caracterizados empregando-se técnicas espectroscópicas. Tais técnicas permitem a compreensão mais detalhada de tais processos, o que favorece o desenvolvimento e aplicação da espectroscopia nas mais diversas áreas científicas. Quando esta radiação está selecionada para a região do ultravioleta ou visível, uma parcela deste espectro pode ser absorvida, como resultado da interação direta com uma

molécula. A quantidade de energia absorvida depende do comprimento de onda da radiação e da estrutura química da molécula. A absorção de energia eletromagnética é quantizada e conduz à passagem de elétrons dos orbitais do estado fundamental para o estado excitado singlete de menor energia, ou seja, a radiação que é absorvida tem energia igual à diferença de energia entre os estados excitados singlete e fundamental.

Os espectros de absorção no UV-visível são registrados relacionando-se a intensidade de absorção de luz (absorbância, transmitância ou densidade óptica) em função do comprimento de onda (λ - nm) ou frequência.

A absorção luminosa está diretamente relacionada com a concentração molar da espécie cromófora presente na amostra, sendo deduzida a partir da relação da intensidade de luz absorvida (dI) por uma secção (dx) que é proporcional a intensidade de luz incidente I e a σ e n , sendo σ a constante de proporcionalidade e n o número de moléculas por centímetro cúbico (Equação 6).

$$\frac{dI}{dx} = -I\sigma n \quad (6)$$

Integrando a relação acima temos, para um limite de $x \rightarrow 0$ e considerando $I = I_0$:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\sigma n d \quad (7)$$

Sendo d o caminho óptico da amostra. A equação 7 é a primeira lei de Lamber-Beer para absorção de luz, a qual é usualmente utilizada como:

$$\ln \frac{I}{I_0} = \varepsilon c d = \textit{densidade \acute{o}ptica} \quad (8)$$

Sendo ε a constante ou coeficiente de extinção molar e c a concentração molar da amostra, respondendo linearmente para soluções diluídas dependendo da solubilidade e da tendência intrínseca de dimerização do composto.

I.6.2 – Espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário

A fluorescência é um processo radiativo no qual uma molécula excitada perde a energia absorvida sob a forma de emissão de luz ao decair do estado excitado singlete para o estado fundamental (Diagrama de Perrin-Jablonski – Figura 4). A espectroscopia de fluorescência pode ser utilizada para se obter informações valiosas a respeito de sistemas biológicos, sendo amplamente empregada em estudos de estruturas moleculares, interações entre moléculas, sondagem de ambientes experimentados por fluoróforos e análise de traços de materiais luminescentes (1). As principais vantagens da técnica são várias, destacando-se:

- a) seletividade a comprimentos de onda de excitação e emissão;
- b) sensibilidade de um fóton com concentração de sub-picograma de material;
- c) variedade de métodos de amostragem (soluções concentradas e diluídas, superfícies sólidas, suspensões, etc.).

Esta técnica se baseia no princípio de emissão de luz, após absorção em comprimento de onda de excitação, fenômeno denominado “deslocamento de Stoke”. O espectro de emissão resulta na imagem especular da banda de absorção com deslocamento para uma região de maior comprimento de onda, fato este explicado devido perda parcial de energia consumida por outros processos não radiativos de relaxação molecular.

A instrumentação necessita ser capaz de medir intensidades de luz em vários comprimentos de onda de emissão da amostra e também permitir irradiação da amostra em vários comprimentos de onda definidos. O arranjo normal do instrumento é composto de dois monocromadores com canal de emissão de fluorescência disposto a 90° do canal de excitação. Esta geometria é arranjada de modo a minimizar os espalhamentos Raman e Rayleigh característicos e assim eliminar a interferência da luz transmitida pelo sinal de emissão. Na prática, entretanto, o espalhamento Raman pode ser utilizado para determinar a sensibilidade do instrumento (1).

I.6.3 – Espectroscopia de absorção resolvida no tempo

O estudo das espécies excitadas *tripletes* é fundamental para se compreender e mesmo comprovar o comportamento fotofísico dos fotossensibilizadores utilizados em Terapia Fotodinâmica (TFD). Sabe-se que os mecanismos de fotossensibilização estão diretamente relacionados com a formação destas espécies excitadas. Conforme ilustra o diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 4), temos a demonstração de produção de espécies radiativos de oxigênio (EROs) que induzem os danos foto-oxidativos dependem

diretamente das transições de energia entre o fotossensibilizador no estado excitado triplete e substrato celular (Tipo I) e/ou oxigênio molecular (Tipo II).

Vários compostos químicos possuem a capacidade de absorver luz, fato este resultado da presença de grupamentos cromóforos como insaturações conjugadas características de fármacos aromáticos, como, por exemplo, os derivados porfirínicos, clorínicos e ftalocianínicos amplamente administrados em TFD. Este fenômeno leva a indução de processos radiativos resultantes das transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$, respectivamente na ordem de crescente de energia.

A formação das espécies triplete se dá a partir de processo radiativo por cruzamento intersistemas, resultando na inversão do sentido do spin eletrônico (Figura 10).

Figura 10 - Distinção entre os estados excitados *singlete* e *triplete* para um cromóforo do tipo C=O (sp²).

A espectroscopia por pulso de laser é uma técnica utilizada para o estudo destes processos fotoquímicos primários. O sistema empregado proporciona o estudo das

características de emissão e absorção de espécies transientes, sendo uma extensão dos espectrofotômetros no estado estacionário.

O método consiste basicamente na excitação da amostra por um pulso de luz de alta intensidade (laser) o qual é absorvido pela amostra induzindo os processos fotofísicos que levam a formação das espécies transientes. Estes intermediários possuem um tempo de vida característico, que pode ser obtido a partir do cálculo de sua cinética de decaimento.

Os principais componentes do espectrofotômetro para medidas de fotólise por pulso laser são: fonte de excitação laser, fonte de análise (usualmente uma lâmpada de Xenônio) compartimento de amostra, monocromador ou filtros de análise, fotodetector (fotomultiplicadora ou fotodiodo de silício), um registrador de alta velocidade (osciloscópio digital) e computador para armazenagem do sinal.

I.6.4 – Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

Os valores de tempo de vida de fluorescência (τ_f) podem revelar a frequência de encontros colisionais com agentes supressores, a velocidade de transferência de energia e as reações que ocorrem no estado excitado. A natureza precisa do decaimento de fluorescência pode também revelar detalhes sobre as interações do fluoróforo com o meio onde se encontra compartimentalizado(1). O monitoramento dos decaimentos de fluorescência é um procedimento usual para se obter informações sobre as taxas de transições do estado eletrônico singlete para espécies moleculares.

O princípio desta técnica baseia-se no conceito de que a distribuição de probabilidade de emissão de fóton, após o evento de excitação de uma amostra fluorescente, é proporcional à distribuição de intensidade de fluorescência no tempo para os fótons emitidos como resultado da excitação da amostra. Através da contagem sucessiva de fótons correlacionados com o tempo, pode-se construir um histograma que representa esta probabilidade de distribuição. Desta forma, cada contagem individual de fóton detectado deve estar vinculada no máximo a um pulso de excitação, sendo o histograma o resultado aditivo de um grande número de pulsos de excitação da amostra.

II – Objetivos

Viabilizar a utilização de nanoemulsões (NE) como veículos de liberação para o fármaco fotossensibilizador Foscan[®], *meso*-tetra(hidroxifenil)clorina, (*m*-THPC), em Terapia Fotodinâmica (TFD) do câncer, através de estudos envolvendo técnicas espectroscópicas estacionárias e resolvidas no tempo.

Elucidar o perfil de interação *in vitro* da formulação com a pele, avaliando fenômenos de permeação cutânea, retenção e acúmulo do fármaco através dos tecidos.

III – Parte Experimental

III.1 – Materiais

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura, obtida através da filtragem sequencial em colunas de troca iônica de um sistema E-Pure da Barnstead modelo D 3750, com filtragem final em membrana de 0,2 μm de diâmetro, pressão máxima de operação 50 psi (3,4 kg/cm^2) e resistividade final de 18 $\text{M}\Omega \times \text{cm}$.

Os materiais relacionados a seguir foram utilizados sem nenhum tipo de tratamento prévio:

- Foscan[®] [5,10,15,20-tetrakis(*m*-hidroxifenil)clorina (*m*-THPC)] (sintetizado e purificado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Philippe Maillard, Laboratoire de Chimie Bioorganique, Institute Curie, Orsay, França).
- Epikuron 170[®] (Lucas Meyer - França).
- Poloxamer 188[®] (ICI – Alemanha).
- Miglyol 812N[®] (Stallergenes S.A).
- Dimetil-sulfóxido - DMSO p.a. (Mallinckrodt).
- Acetona grau espectroscópico (Mallinckrodt).
- Álcool metílico grau espectroscópico (Mallinckrodt).
- Álcool etílico grau espectroscópico (Mallinckrodt).

Para o preparo das soluções de tampão biológico foram utilizados sais de fosfato de monossódico e dissódico da Aldrich, na concentração de 10 mM em solução, pH 7,4, cloreto de sódio 0,137 M e cloreto de potássio 0,0027 M.

As peles empregadas nos experimentos *in vitro* de permeação e retenção cutânea foram dissecadas da parte anterior de orelhas de porcos, obtidas diretamente do abatedouro. A utilização das peles está de acordo com as normas estabelecidas pelo comitê de ética do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP.

III.2 – Equipamentos

Para se determinar a estabilidade físico-química das formulações utilizou-se um **Light-Scattering PCS (Espectroscopia de Foto Correlação) da Malvern Instruments, modelo Zetasizer 3000 HS_A**, ajustado na potência de 10 mW com luz laser a 633 nm, possuindo capacidade para determinação de tamanhos de partículas no intervalo de 2 nm a 3 µm. Este equipamento pertence ao grupo de pesquisa da Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli do Departamento de Química da FFCLRP-USP, sendo gentilmente cedido para a realização das medidas de tamanho por espalhamento dinâmico de fótons.

Nos estudos espectroscópicos de absorção foram utilizados os **espectrofotômetros de UV-Vis modelo Lambda 20 da Perkin Elmer** e o **U-3000 da HITACHI**.

Para a determinação dos espectros de emissão de fluorescência foi utilizado um **espectrofluorímetro modelo Fluorolog 3 da Spex** (Figura 11), composto por uma fonte de excitação, no caso uma lâmpada de Xe 400 W responsável pela emissão de irradiação luminosa que é captada por um conjunto de lentes e espelhos refletores sendo direcionada para o primeiro monocromador de excitação do tipo single-grating e posteriormente para o segundo monocromador de emissão do tipo double-grating. Após passar pela grade de lentes e espelhos, o feixe luminoso é direcionado para a terceira fenda C (emissão) que atua na interface do monocromador com o detector fotovoltaico, o qual é responsável pela conversão do sinal de fótons em corrente elétrica, sendo as bandas espectrais resultantes finalmente tratadas e apresentadas por um software específico do microcomputador.

Figura 11 - Esquema ilustrativo para os conjuntos de dispositivos ópticos do espectrofluorímetro Fluorolog 3 Spex (Yobin Ivon Inc.). Em azul as fendas (*slits*) = A: fenda de excitação, B = fenda de emissão 1, e C = fenda de emissão 2.

Para a determinação do tempo de vida de fluorescência utilizamos o **espectrofotômetro de fluorescência resolvida no tempo, modelo FL9000CD da Edinburg Analytical Instruments**, com controle de temperatura e agitação, e que possui como fonte de luz uma lâmpada de H_2 operando à 40 KHz de frequência e ajuste de leitura para aproximadamente 4000 counts. Todas as medidas de decaimento foram realizadas na presença de oxigênio, com agitação e temperatura controlada. O software fornecido pela Edinburg Instruments foi empregado na obtenção e análise das curvas de decaimento

exponenciais, baseando-se no algoritmo iterativo de Marquadt (análise não linear dos mínimos quadrados).

A fonte de irradiação laser, utilizada nos experimentos de determinação do tempo de vida de fosforescência do Foscan[®], foi um sistema **LASER** (Figura 12) pulsado de **Nd-YAG (Continuum, Santa Clara, CA) modelo Surelite I-10**, com frequência de pulsos de 8 ns, com intervalo de potência de 1 a 50 mJ por pulso. O equipamento foi ajustado para utilização do terceiro harmônico como fonte de excitação em 355 nm. Para calibração da potência foi utilizado um *power meter* **Field Master of Coherent (Santa Clara, CA)** com uma cabeça de detecção modelo L-30V. Para varredura no UV-visível ($\lambda = 300\text{-}800\text{ nm}$) foi utilizada como fonte de irradiação uma lâmpada de Xenônio com 400 W de potência. Para detecção do sinal foi utilizado um **monocromador da Bentham Instruments LTDA (Livingston, UK), modelo M300**, e uma **fotomultiplicadora da Hamamatsu modelo R928P**. Os sinais foram coletados utilizando-se um **osciloscópio digital da Tetronix modelo TDS 340A**, sendo consecutivamente transferidos para um microcomputador e analisados com auxílio do **software Gem[®]** fornecido pela **Edinburgh Analytical Instruments (Livingston, UK)**.

Figura 12 – Representação esquemática do sistema laser Nd-YAG utilizado em fotólise pulsada.

Nos estudos envolvendo a detecção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o sinal de emissão de fosforescência deste foi identificado em 1270 nm, utilizando-se um **fotodetector de germânio da North Coast Scientific Corporation, modelo 823A**. Os sinais dos transientes gerados e do oxigênio singlete foram detectados por um osciloscópio digital (Tektronix modelo TDS 340A), transferido para um computador e, então, processado e analisado utilizando-se o software operacional do próprio instrumento.

Além desses sistemas ópticos citados, foram utilizados os seguintes equipamentos: **balança eletrônica** da Denver Instruments Company modelo A-200 DS, **sistema vortex** Phoenix modelo AP-50, **ultrasom** marca Branson modelo 2210, **pH-metro** modelo

accumet[®] 50 da Fischer Scientific, **rotaevaporador** modelo R-124 da Büchi com controle térmico. Para o controle da temperatura dos experimentos foram utilizados **banhos termostatizáveis da PolyScience**.

Todos os experimentos de permeação e retenção cutânea foram desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP-USP, sob coordenação da Prof^ª. Dr^ª. Maria Vitória L. B. Bentley, sendo empregado o **sistema de coleta automática com carrossel Microetti**, acoplado a seis **células de difusão de Franz** *Aparatus 8 USP* conforme a ilustração da Figura 13 abaixo, acoplado a um conjunto de seringas para bombeamento sob vácuo (“Syringe Pump”). A velocidade de agitação foi controlada utilizando-se uma **placa de agitação multiponto da Variomag**, com controle de temperatura realizado em conjunto com um **banho termostatizável da Fischer Scientific**.

Figura 13 - Modelo da célula de difusão de Franz utilizada no experimento de determinação do perfil de permeação cutânea.

Na técnica de *tape-stripping* foi utilizado um **homogenizador tipo ultra-turrax da IKA, modelo T-25 Basic** com ajuste manual de velocidade. As **fitas adesivas** utilizadas foram do tipo **Durex 20 mm** convencional da **3M**.

Empregou-se para uniformização da espessura das peles **um dermatômetro 75 mm da Robbins Instruments** (Figura 14) utilizando um micro-motor com ajuste de velocidade máxima de 3000 RPM.

Figura 14 - Dermatômetro 75 mm da Robbins Instruments, empregado para se uniformizar a espessura das peles utilizadas em todos os ensaios *in vitro*.

III.3 – Metodologias

III.3.1 – Estabilidade e Estudos Fotofísicos

III.3.1.1 – Preparação das nanoemulsões (NE) através do método de emulsificação por adição direta de fases

As NE foram preparadas seguindo-se o método de emulsificação por adição direta de fases ilustrado na Figura 15 a seguir.

Figura 15 – Esquema ilustrativo para as etapas de síntese das nanoemulsões (NE) obtidas a partir do método de emulsificação adição direta de fases.

A primeira etapa consiste no preparo de uma solução aquosa obtida a partir da dissolução do surfactante não-iônico Poloxamer 188[®] (Figura 16), com maior caráter polar, em água ultra-pura com concentração final de $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, sob agitação constante e temperatura ambiente. A segunda fase foi obtida a partir da dissolução do surfactante, Epikuron 170[®], um fosfolípido natural da soja, (Figura 16) em acetona P.A. na concentração final de $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, sob agitação constante e temperatura de 55 °C .

Figura 16 – Estrutura química dos surfactantes e óleo utilizado no preparo das NE: (A) Epikuron 170[®], fosfatidilcolina de soja, (B) Poloxamer 188[®], polietileno-polipropileno-glicol e (C) Miglyol 812N[®] (diglicerídio miristato caprílico).

Após total dissolução do soluto, adiciona-se uma alíquota de Miglyol 812N[®] (óleo digliceril miristato caprílico – Figura 16) para concentração final de 2,5% v/v. Consecutivamente, utilizando-se uma seringa, adicionou-se lentamente a fase orgânica (1 gota/s) sob a fase aquosa sob agitação moderada e temperatura de 55 °C, iniciando-se a etapa de emulsificação. Após total adição, a mistura foi estabilizada por 20 minutos sob agitação e controle de temperatura constante, sendo finalmente extraído todo o solvente

orgânico até volume final projetado, utilizando-se rota-evaporação sob pressão reduzida em banho-maria com temperatura ajustada entre 80 °C e 90 °C.

O fármaco fotossensibilizador foi incorporado à formulação na etapa de preparo da fase orgânica, sendo previamente dissolvido no óleo Miglyol 812N[®], na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹.

O promotor de permeação cutânea, dimetil-sulfóxido (DMSO – Figura 17), foi adicionado após obtenção final da formulação, sendo solubilizado sob agitação intensa em temperatura ambiente.

Figura 17 - Estrutura química do dimetil-sulfóxido (DMSO), empregado como promotor de permeação cutânea.

III.3.1.2 – Determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas coloidais e avaliação da estabilidade físico-química a partir da técnica de espalhamento dinâmico de fótons

O diâmetro médio das partículas coloidais foi determinado utilizando-se espectroscopia de fotocorrelação (PCS) baseada no espalhamento dinâmico de fótons. Foram avaliadas as distribuições de tamanhos de partículas para as amostras de NE associadas ou não ao fármaco Foscan[®]. As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo, com fator de diluição de 1:100 empregando-se água ultrapura como meio receptor.

A técnica de espalhamento dinâmico de fótons se baseia na análise do movimento Browniano de partículas em suspensão coloidal, que é descrito por uma função de correlação (G) com decaimento exponencial, conforme apresentado pela equação 9.

$$G(\tau) = A[1 + B \exp(-2\Gamma \tau)] \quad (9)$$

Sendo A , a linha de base, B , o intercepto para a função de correlação, $\Gamma = Dq^2$, sendo D o coeficiente de difusão translacional, $q = (4\pi n / \lambda_o) \sin(\theta / 2)$, sendo n , o índice de refração da solução, λ_o , o comprimento de onda do laser, θ , o ângulo da luz espalhada e τ , é o tempo em segundos gasto para se determinar a curva de correlação.

Os tamanhos médios podem ser calculados a partir da função de correlação utilizando-se vários algoritmos presentes no software do equipamento. Em nosso trabalho utilizamos o algoritmo CONTIN, mais satisfatório para distribuições dentro do intervalo de tamanho esperado.

A estabilidade fotofísica e físico-química das NE foram avaliadas monitorando-se a os espectros de emissão de fluorescências e a distribuição média de tamanho das partículas, respectivamente durante um período de até 9 semanas.

III.3.1.3 – Avaliação da influência da concentração de DMSO na estabilidade físico-química das formulações finais: determinação de uma concentração de trabalho

A influência físico-química do DMSO na estabilidade das formulações foi avaliada em função do tempo por um período de quarenta dias, variando-se a concentração do aditivo de 0,00 a 1,00 % na razão de volumes. Realizamos o monitoramento do diâmetro médio das partículas através da técnica de espalhamento dinâmico de fótons.

O DMSO foi adicionado diretamente à amostra após a etapa de extração do solvente, sob agitação moderada e temperatura ambiente.

A adsorção de um emulsificante na interface óleo/água, pelo abaixamento da tensão superficial durante o preparo da amostra, auxilia a dispersão do óleo em gotículas de pequeno tamanho e ajuda a manutenção das partículas em estado disperso. A não ser que a tensão superficial seja zero, há uma tendência para as gotículas oleosas coalescerem com redução da área de contato óleo/água; contudo a presença de uma camada de surfactante na superfície das gotículas reduz a possibilidade de colisões, conduzindo à coalescência das gotículas, induzindo um aumento no potencial zeta negativo ou positivo devido interferência na força iônica do meio.

Os surfactantes empregados possuem baixíssima toxicidade e baixa sensibilidade a aditivos, adsorvendo-se diretamente nas gotículas da emulsão. Embora geralmente reduzam os potenciais zeta (ξ), que por sua vez devem ficar abaixo de -0,30 mV ou acima de 0,30 mV aproximadamente, demonstrando a estabilidade físico-química entre a camada de Stern e o plano de cisalhamento entre as cargas superficiais. Esta interação iônica do tensoativo mantém a estabilidade da formulação através da formação de uma camada hidratada na

partícula hidrófoba, resultando em uma altíssima estabilidade físico-química consequência da indução de forças repulsivas estéricas.

III.3.1.4 – Caracterização das propriedades fotofísicas no estado estacionário para o Foscan[®] em meio homogêneo e heterogêneo

A caracterização espectroscópica no estado estacionário foi determinada a partir da obtenção dos espectros de absorção e emissão de fluorescência para o fármaco em meio homogêneo (metanol grau espectroscópico) e quando associado as nanoemulsões.

As medidas de absorção foram determinadas de 300 nm a 800 nm, varrendo-se toda a região do visível e ultravioleta próximo.

Para determinação do perfil de emissão de fluorescência, excitamos as amostras com comprimento de onda fixo em 430 nm, com conjunto de fendas em 5 nm, 10 nm e 5 nm respectivamente para as fendas de excitação e emissão como mostra a figura 11.

Todas as medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

III.3.1.5 – Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) em meio homogêneo e heterogêneo

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) foi determinado para o fármaco fotossensibilizador Foscan[®] encapsulado em NE e NE/DMSO 0,5% utilizando-se como padrão uma solução do próprio composto em álcool metílico grau espectroscópico ($\Phi_F = 0,089$), como determinado por Bonnett (15).

As concentrações finais foram ajustadas para se obter uma absorbância máxima de aproximadamente 0,01, em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, no comprimento de onda de excitação, de forma a garantir uma minimização do efeito da concentração, que pode atuar como um *filtro interno* influenciando diretamente no resultado esperado.

Os espectros de absorção foram registrados na região do UV-visível, varrendo-se o intervalo de 300 nm a 800 nm.

As bandas de emissão foram adquiridas com excitação fixa em 430 nm, analisando-se o intervalo de 600 nm a 800 nm.

O rendimento quântico foi determinado a partir do método relativo descrito por Eaton (1988) (49;50) registrando-se os espectros de absorção e emissão de fluorescência corrigido, tanto para o fluoróforo padrão quanto para as amostras, sendo calculado a partir da equação 10, a seguir.

$$\phi_F = \left[\left(\frac{A_x}{A_p} \right) \cdot \left(\frac{DO_p}{DO_x} \right) \cdot \left(\frac{n_p^2}{n_x^2} \right) \right] \cdot \phi_p \quad (10)$$

Os subscritos x e p são referentes à amostra e ao padrão, respectivamente, A é a área do espectro de emissão de fluorescência corrigido, determinada diretamente a partir do software do equipamento, DO é a densidade óptica no comprimento de onda de excitação, n é o índice de refração do meio e Φ_F o rendimento quântico de fluorescência.

III.3.1.6 – Medidas de fluorescência resolvida no tempo: determinação do tempo de vida *singlete-singlete* (τ_s)

A técnica de contagem simples de fótons foi utilizada para se determinar os tempos de vida de fluorescência (τ_s) para as amostras do fármaco em estudo. Empregamos como referência uma solução do próprio composto em álcool metílico, comparando-se suas propriedades fotofísicas com dados disponíveis na literatura (15).

O tempo de vida de transição entre os estados excitados *singlete-singlete* foi calculado a partir das curvas de decaimento exponencial características, empregando-se como fonte de excitação uma lâmpada de $H_2(g)$, operando com uma frequência de 40 kHz e pressão de 0,30 Bar em temperatura ambiente, condições estas mantidas durante todas as medidas.

O software utilizado para aquisição e tratamento dos resultados baseia-se em uma relação matemática (Equação 11), que calcula um ajuste não linear dos mínimos quadrados no espaço de convolução entre o pulso de excitação, medido pelo espalhamento, e a função de decaimento descrito pelo algoritmo iterativo de Marquadt, partindo-se do princípio da análise não linear dos mínimos quadrados.

$$I(t) = A_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + \dots + A_4 \exp\left(-\frac{t}{\tau_4}\right) \quad (11)$$

Sendo A_i um termo pré-exponencial arbitrário e τ_i o tempo de vida para o componente i .

Foram utilizadas celas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, com controle de temperatura constante para todas as medidas.

III.3.1.7 – Determinação do espectro de absorção do transiente *triplete-triplete* a partir de fotólise por pulso laser

Inicialmente foram preparadas amostras de Foscan[®] em NE, NE/DMSO 0,5% v/v e em álcool metílico grau espectroscópico, utilizado como referência, sendo previamente obtidos os espectros de absorção no estado fundamental (UV-visível), com ajustes na concentração final do fármaco para se garantir uma absorbância de aproximadamente 0,3 na região espectral de excitação (355 nm), garantindo-se uma concentração mínima para produção das espécies transientes.

Logo após o preparo das amostras realizamos o degaseamento com N₂(g) grau espectroscópico para total saturação do ambiente químico, sendo necessária a utilização deste gás inerte para se garantir a remoção de outras espécies gasosas como o O₂(g) que pode influenciar diretamente na detecção dos produtos esperados, aniquilando rapidamente os transientes triplete gerados.

Foram determinados os perfis de decaimento exponenciais para os transientes formados com o cálculo de seus respectivos tempos de vida e taxa de distribuição com ajustes de frequência em 0,5 Hz e conjunto de 10 tiros sequenciais com potência laser de aproximadamente 30 mJ.

O espectro de absorção do transiente foi determinado varrendo-se o espectro eletromagnético na região do visível, de 300 a 800 nm, a partir de excitação das amostras com feixe de luz ajustado para o terceiro harmônico em 355 nm, com uma potência média

de 30 mJ por pulso para todas as medidas. Utilizaram-se disparos ajustados na razão de 3 tiros seqüenciais para cada intervalo de 10 nm. As amostras foram trocadas a cada intervalo de 100 nm com o intuito de se evitar a fotodegradação da mesma.

As escalas do osciloscópio digital foram fixadas em 100 mV e 1 μ s para todas as medidas. Todas as medidas foram realizadas sob agitação magnética constante e temperatura ambiente.

III.3.1.8 – Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_{Δ})

Dentre os estudos fotoquímicos e fotofísicos envolvendo fármacos fotossensibilizadores ativos no processo fotodinâmico, esta análise é de fundamental importância uma vez que quantifica a produção da principal espécie reativa responsável pela destruição do tecido tumoral, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Esta espécie reativa em conjunto com outras espécies radicalares promovem uma série de processos foto-oxidativos em sítios endógenos situados tanto no citoplasma celular quanto na estrutura da membrana fosfolipídica (lipídios, proteínas, etc.).

Os rendimentos quânticos foram determinados em duplicata, a partir de amostras com absorvância de aproximadamente 0,3 no comprimento de onda de excitação. Utilizamos cubetas de 1 cm de caminho óptico seladas com septos para degaseamento, garantindo uma microatmosfera saturada com $\text{O}_2(\text{g})$.

Os dados foram obtidos por fotólise por pulso laser utilizando-se o sistema laser ND-YAG, ajustado para o harmônico de 355 nm como fonte de excitação, sendo os sinais de fosforescência captados por um fotodetector de germânio em 1270 nm.

Os valores foram calculados a partir do método descrito por Arbogast (51) (Equação 12) utilizando-se como padrão uma solução de Feoforbide-a em etanol espectroscópico. Tal composto é um derivado bacterioclorínico, possuindo uma boa produção da espécie radicalar em estudo ($\Phi_{\Delta} = 0,54$), sendo muito utilizado como referência nestes ensaios espectroscópicos.

$$\Phi_{\Delta} = (I_x / I_p) \cdot (\tau_p / \tau_x) \cdot \Phi_{\Delta P} \quad (12)$$

Sendo Φ_{Δ} o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete, I_x e I_p a intensidade de emissão de fosforescência da amostras e padrão respectivamente, τ_x e τ_p e tempo de vida de fosforescência para a amostra e padrão respectivamente e $\Phi_{\Delta P}$ o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete do padrão.

III. 3.2 – Ensaios *in vitro*

III.3.2.1 – Obtenção, extração e armazenagem das peles

As peles utilizadas em todos os ensaios *in vitro* foram extraídas da parte posterior de orelhas de porcos.

As orelhas foram obtidas em abatedouro, logo após a morte do animal, sendo recolhidas sem terem sido escaldadas.

Inicialmente, as orelhas foram bem lavadas, removendo todos os resíduos de sujeira e sangue. Após fixar em uma superfície de isopor, com auxílio de agulhas, a pele foi então

totalmente dissecada utilizando-se um bisturi e uma pinça. Posteriormente, com uma tesoura retiraram-se os resíduos de gordura e vasos sanguíneos da parte inferior da pele dissecada.

O tecido então foi dermatomizado, utilizando-se um dermatômetro (Figura 14) com lâminas ajustadas para se obter um corte padronizado de espessura constante para todos os tecidos, além de eliminar basicamente as camadas homogêneas inferiores de gordura, isolando então as faixas de interesse a serem estudadas.

III.3.2.2 – Determinação de um método analítico para a quantificação do fármaco por espectrofluorometria

Para se quantificar o fármaco nos ensaios de permeação e retenção *in vitro* foi necessário obter um método padrão analítico, o qual se baseou no potencial fluorescente do princípio ativo, propiciando assim a construção de curvas padrão de calibração que se adequaram às características de cada etapa experimental.

Prepararam-se, por diluições sucessivas, com auxílio de um conjunto de microseringas Hamilton, uma série de amostras no intervalo de concentração de 0,01 a 3,00 μ M de fármaco nos respectivos solventes de extração tecidual empregados.

Os parâmetros experimentais utilizados foram os mesmos para todas as medidas, com excitação fixada em 430 nm, fendas ajustadas com aberturas de 10 nm, 20 nm e 10 nm para excitação e emissão respectivamente e intervalo de varredura de 600 nm a 800 nm.

As curvas de calibração foram então construídas relacionando-se a intensidade de fluorescência no comprimento máximo de emissão em função da concentração do fármaco fotossensibilizador para cada solvente utilizado.

A intensidade de fluorescência é calculada partindo-se da relação:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon C d} \quad (13)$$

sendo I = intensidade de luz transmitida através da amostra, I_0 = intensidade de luz incidente na amostra, ε = absorvidade molar ($M^{-1}.cm^{-1}$), C = concentração molar da solução, d = caminho óptico.

Considerando que a luz absorvida (I_A) corresponde a:

$$I_A = I - I_0 \quad (14)$$

A intensidade de fluorescência (I_F) é dada por $I_A \Phi_F$, onde Φ_F é o rendimento quântico de fluorescência da amostra. Desta estabelecemos uma relação direta entre a intensidade máxima de emissão em função da concentração da espécie molar (equação 15).

$$I_F = I_0 \Phi_F (1 - 10^{-\varepsilon C d}) \quad (15)$$

III.3.2.3 – Determinação do perfil de permeação cutânea *in vitro*

O perfil de permeação cutânea pelas camadas da pele foi avaliado para o fármaco fotossensibilizador Foscan[®] associado às NE, na presença e ausência do DMSO, comparando-se quando o mesmo foi dissolvido em solução tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, método convencional para administração tópica em alguns protocolos clínicos de TFD. (24;52;53). As amostras do fármaco veiculado foram preparadas seguindo-se o protocolo apresentado inicialmente no início desta seção. A concentração do fármaco em solução fisiológica foi de 1,0 mg/mL, dissolvido diretamente em tampão fosfato salino em pH biológico (pH 7,4). Na etapa experimental foi utilizado um sistema de coleta automatizado descrito na seção III.2 e ilustrado na Figura 18, a seguir.

Figura 18 - Esquema simplificado ilustrando o sistema de coleta automatizada acoplado às células difusionais.

Após limpeza de todo o sistema, preencheu-se o recipiente de armazenamento e também as células de difusão com uma solução receptora tampão fosfato 10 mM pH 7,4 com etanol 20% v/v.

Consecutivamente, montaram-se as células de difusão colocando-se respectivamente: pele dermatomizada, espaçadores, amostra, disco de acrílico para oclusão total do sistema e presilhas de travamento.

Durante todo o procedimento experimental, manteve-se temperatura estável monitorada em 37 °C, mimetizando o ambiente fisiológico, com velocidade de agitação de aproximadamente 300 RPM.

Montou-se um protocolo experimental para o coletor automático com intervalos de 1 hora num total de 13 coletas, considerando-se o tempo zero.

Para cada amostra coletada foram retirados 2,2 mL de meio receptor, sendo 0,7 mL para lavagem das mangueiras e posterior descarte e 1,5 mL armazenados em frascos âmbar. Como o sistema foi projetado para fluxo estático, o mesmo volume foi repostado paralelamente no momento de coleta. Após término do ciclo de permeação, as amostras foram armazenadas em *freezer* para posterior quantificação por espectrofluorometria.

A quantidade em massa de fármaco permeada pelos tecidos foi quantificada a partir da equação 16, a seguir.

$$Q_{real,t} = (C_{mensurada,t}).V_r + (\sum^{n-1} C_a).V_a \quad (16)$$

Sendo, Q a quantidade permeada acumulada, Q_{real} o valor real no tempo t , $C_{\text{mensurada},t}$ a concentração mensurada da coleta no tempo t , V_r o volume da célula de difusão, V_a o volume de amostra removido e C_a a concentração da amostra removida.

Assim, a quantidade realmente permeada no tempo t , (Q_{real}) é igual à quantidade mensurada no tempo t , ($Q_{\text{mensurada}} = C_{\text{mensurada}} \cdot V_r$) somada ao volume total retirado de solução receptora de todas as amostras anteriores.

A quantidade de fármaco foi calculada levando-se em consideração a razão por área de tecido ($1,77 \text{ cm}^2$) exposta para aplicação.

III.3.2.4 – Determinação do perfil de retenção cutânea *in vitro* após 12 horas de aplicação

O perfil de retenção do fármaco nas camadas da pele foi determinado utilizando-se a técnica de *tape stripping* e *homogeneização total* dos tecidos respectivamente, descritas a seguir.

Para avaliação da quantidade de fármaco fotossensibilizador retido no estrato-córneo, realizou-se a extração desta camada utilizando-se a técnica de *tape stripping* que consiste basicamente no emprego de fitas adesivas do tipo *durex* (3M) cortadas em tamanhos únicos sem contado direto com o tecido humano e posterior imersão em solvente orgânico adequado.

Após término das coletas, a pele foi fixada sob uma placa de isopor recoberta com papel alumínio, ficando exposta somente à região de $1,77 \text{ cm}^2$ onde foi aplicada a amostra. Limpou-se delicadamente esta superfície com auxílio de um algodão embebido em água

destilada. Retiraram-se, então, as camadas consecutivas de estrato córneo aderindo-se às fitas adesivas na região delimitada. Este procedimento foi realizado até remoção total da camada, momento este identificado quando a fita não se adere no material da pele e também por visível hidratação da mesma. Ficou caracterizado que um total de 15 fitas são suficientes para retirada total do estrato córneo.

O ativo foi extraído utilizando-se álcool metílico grau espectroscópico, substância esta que atua como bom solvente para a droga. As fitas foram imersas em 5,0 mL deste solvente orgânico em tubos de extração, sendo submetidas a agitação por 1 minuto em sistema vórtex. Consecutivamente, levou-se a um banho de ultra-som por 20 minutos. As fitas foram retiradas do meio extrator sendo o mesmo estocado em *freezer* para posterior quantificação por espectrofluorometria.

As peles sem estrato córneo (epiderme+derme) foram picadas e adicionadas em tubos de extração contendo 5,0 mL de álcool metílico grau espectroscópico. Na sequência, as amostras foram trituradas durante 1 minuto utilizando-se um homogeneizador do tipo ultra-turrax com velocidade de 13000 RPM. Os meios então foram filtrados utilizando-se algodão ou papel de filtragem para separar os resíduos de tecidos, sendo estocadas em *freezer* para posterior análise e quantificação por espectrofluorometria.

III.3.2.5 – Estudos “*in vitro*” da influência de DMSO na permeação cutânea do Foscan[®] em NE

A influência do composto dimetil-sulfóxido (DMSO), empregado como promotor de permeação cutânea, foi investigada nos ensaios *in vitro* variando-se a sua concentração na formulação final das NE.

Prepararam-se amostras de Foscan[®]/NE variando-se a concentração de DMSO nas proporções de 0,5 %, 5,0% e 10% em razão de volumes (v/v).

Todo o protocolo experimental apresentado na seção III.3.2.4 foi repetido, avaliando-se a permeação cutânea *in vitro* de cada amostra em questão. Os resultados foram obtidos seguindo-se o mesmo procedimento analítico sendo relacionado obtendo-se um perfil de permeação para cada formulação.

III.3.2.6 – Estudos “*in vitro*” da influência de DMSO na retenção cutânea do Foscan[®] em NE

Avaliamos também a influência do DMSO na retenção cutânea, determinando a quantidade retida no estrato córneo bem como a acumulada nas camadas mais profundas do tecido (epiderme+derme).

Foram aplicadas amostras de Foscan[®]/NE variando-se a concentração de DMSO em 0,5%, 5,0% e 10% na razão de volumes.

Utilizamos todo o procedimento experimental descrito anteriormente na seção III.3.2.6, realizando-se o *tape stripping* e *homogeneização total* dos tecidos para cada formulação em quintuplicada para tratamento estatístico.

IV – Resultados e Discussão

IV.1 – Avaliação Físico-Química

IV.1.1 – Determinação da tamanho médio de partículas para as nanoemulsões na presença e ausência de Foscan[®]

Os estudos das propriedades morfológicas são de grande importância no desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos. O tamanho das partículas está diretamente relacionado com vários fatores que garantem uma boa eficiência na distribuição, localização e liberação do fármaco. A busca por veículos de liberação nanoestruturados vem crescendo nas últimas décadas, confrontando-se diretamente com o avanço tecnológico gerado pela nanotecnologia em diversas áreas científicas. Sabe-se que a

associação de fármacos com sistemas nanoparticulados aumenta diretamente a razão da taxa de interação superficial veículo/substrato, gerando uma maior eficiência de interação com sítios específicos e assim, obtendo vantagens quanto a biocompatibilidade.

Veículos coloidais possuem estruturas micelares características, dependendo de tipo de emulsão formada. Para emulsões do tipo óleo/água a cadeia apolar do surfactante interage diretamente com as gotículas de óleo reduzindo sua tensão superficial, e, por consequência, resulta na formação de partículas com tamanho extremamente reduzido, dependendo do tipo de surfactantes empregados bem como a metodologia utilizada para obtenção das amostras.

O diâmetro hidrodinâmico e polidispersividade das partículas coloidais foram determinados empregando-se a técnica de espalhamento dinâmico de luz, sendo avaliada a influência do promotor de permeação cutânea DMSO, na presença e ausência do fármaco fotossensibilizador Foscan[®]. Para realização das medidas de tamanho seguimos os protocolos do equipamento, realizando-se uma diluição na razão de 1:100 (formulação/água-ultrapura). Métodos para determinação de tamanho de partículas são baseados em técnicas relativas, dependendo de várias condições experimentais. Quando determinamos o tamanho de uma amostra, deve-se considerar que os resultados são relativos às condições do equipamento e a técnica escolhidos, não sendo, portanto, valores absolutos, os quais devem ser analisados sempre considerando-se cada detalhe e condição experimental.

Os dados obtidos em nossos estudos estão apresentados na Tabela II a seguir.

Tabela II: Tamanhos de partículas determinadas por espalhamento dinâmico de fótons

Amostras	Diâmetros (nm)	Polidispersividade
NE	225,0 ± 1,4	0,187
NE + DMSO	225,0 ± 1,7	0,190
NE + Foscan [®]	250,0 ± 5,0	0,222
NE + Foscan [®] + DMSO	250,0 ± 5,8	0,205

Os resultados obtidos mostram um diâmetro médio de 225,0 nm e 250,0 nm para as partículas na ausência e quando associado ao fármaco Foscan[®], respectivamente. Estes resultados demonstram uma relação físico-química entre do FS e a formulação obtida. Porém, não se percebe uma influencia direta do DMSO nas características morfológicas da partícula, obtendo-se os mesmos tamanhos para ambas amostras, na ausência e presença do fármaco. Todas as medidas apresentaram uma polidispersividade muito baixa, resultado da formação de sistemas monodispersos em solução. Analisando estes resultados, podemos ressaltar que a incorporação do Foscan[®] não alterou significativamente as características das nanoemulsões, resultando em um aumento de diâmetro da ordem de 10 %, justificado pela incorporação do fármaco nas formulações.

Estes dados evidenciam o sucesso da primeira etapa do trabalho que consistia no desenvolvimento de um sistema coloidal de liberação nanoestruturado em associação ao fármaco fotossensibilizador desejado.

IV.1.2 – Avaliação da influência do promotor de permeação cutânea, dimetil-sulfóxido (DMSO), na estabilidade físico-química das nanoemulsões

A influência do DMSO na estabilidade físico-química da formulação foi investigada empregando-se novamente a técnica de determinação do tamanho de partículas por espalhamento de fótons, sendo monitorado o diâmetro médio do colóide em função do tempo.

Inicialmente foram preparadas amostras de NE com DMSO variando-se a concentração de 0,0 a 1,0% na razão de volumes. O aditivo foi incorporado diretamente nas amostras após a fase final do protocolo de obtenção das formulações.

O tamanho médio das partículas foi monitorado para cada amostra por um período de quarenta dias, como mostra a Figura 19.

Figura 19 – Avaliação da influência do DMSO na estabilidade físico-química das NE associados ao Foscan[®]. Determinação do tamanho de partículas por espalhamento de fótons em função do tempo coletados □ 1 dia, ■ 7 dias, ■ 23 dias e ■ 40 dias após o preparo das formulações.

Analisando a Figura 19, foi verificada uma influência direta do DMSO nas características físico-químicas da NE. O tamanho médio das partículas coloidais manteve-se constante na ordem dos 250 nm para todas as concentrações de aditivo, permanecendo na mesma faixa de trabalho. Estes dados ilustram uma alta estabilidade termodinâmica dos sistemas em estudo no período estudado. Esta propriedade é característica de micro/nanoemulsões, as quais são geralmente formadas por uma mistura de tensoativos conferindo uma notável estabilidade morfológica para suas micelas coloidais na interface das fases. A presença do fármaco também não acarretou nenhuma mudança significativa na distribuição média das partículas, as quais se mantiveram como sistemas monodispersos durante todo o período de monitoramento.

Com o intuito de avaliar a estabilidade fotofísica do Foscan[®] em NE e uma possível influência do dimetil-sulfóxido em seu potencial fluoróforo, foi monitorada a emissão de fluorescência em função do tempo, variando-se a concentração de DMSO nas mesmas proporções anteriores.

Os espectros de emissão foram obtidos com excitação fixa em 430 nm, no intervalo de 600 a 800 nm, utilizando um conjunto de fendas de emissão/excitação com abertura de 10 nm, 20 nm e 10 nm respectivamente.

Os dados obtidos estão ilustrados nos Figura 20 a seguir.

Figura 20 – Avaliação da influência do DMSO na estabilidade fotofísica do fármaco fotossensibilizador Foscan[®] em NE. Determinação do tamanho de partículas por espalhamento de fótons em função do tempo: □ 1 dia, ■ 7 dias, ■ 23 dias e ■ 40 dias.

Analisando a figura acima conclui-se que para as concentrações mais baixas de DMSO não se obteve influência significativa no potencial fluoróforo do FS, observando uma intensidade de fluorescência praticamente inalterada no comprimento de onda de leitura (máximo de emissão em 655 nm). Avaliando a perfil de emissão para concentração de DMSO 1,0 % v/v, percebe-se que nesta concentração ocorre uma leve supressão de fluorescência a partir da primeira semana de monitoramento. Este fenômeno pode estar associado a uma possível atuação do aditivo como co-solvente, alterando se certa forma o perfil de emissão do fármaco no comprimento de onda em estudo.

Entretanto, foi avaliado que não houve uma influência substancial no potencial fluoróforo do Foscan[®] em NE. A concentração de trabalho utilizada em todos os estudos foi de 0,5 % v/v, considerando ser esta uma faixa de concentração na qual se encontra uma

minimização das propriedades citotóxicas do aditivo em meio biológico aliando-se ao mesmo tempo, características como promotor de permeação cutânea em testes posteriores *in vitro*.

IV.1.3 – Avaliação da estabilidade físico-química das formulações na ausência e presença de Foscan[®]

A estabilidade termodinâmica é um fator chave no desenvolvimento de um sistema liberação de fármacos. Ao se trabalhar com veículos coloidais, é imprescindível a avaliação de sua estabilidade físico-química levando em consideração a interação química do sistema fármaco/veículo e as possíveis alterações resultantes de aditivos externos a formulação.

As medidas foram realizadas para amostras de NE na ausência e presença de DMSO com concentração fixada em 0,5% v/v, associadas ou não ao Foscan[®] 1,0 mg/mL. Para se realizar as aferições, montou-se um protocolo experimental para todas as leituras de tamanho com fator de diluição de 1:100 em água ultra-pura, conforme especificações operacionais do equipamento. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 21.

Figura 21 – Estudo de estabilidade das NE através do monitoramento do tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de fótons em função do tempo. Amostras: ■ NE, ■ NE/DMSO 0,5% v/v, ■ NE/Foscan 1,0 mg/mL e ■ NE/Foscan/DMSO 0,5 % v/v.

Analisando os dados acima, podemos concluir que nossas formulações apresentam alta estabilidade termodinâmica observada durante o período de monitoramento. Estes resultados indicam que o sistema foi obtido com sucesso, sendo que ambos aditivos, fármaco e promotor de permeação, não proporcionaram modificação físico-química substancial ao sistema em estudo.

Tais resultados permitiram dar continuidade ao trabalho, visando o emprego destas formulações como possíveis sistemas de liberação para o Foscan[®] em TFD, o que pode ser melhor avaliado a partir dos ensaios seguintes.

IV.2 – Avaliação Fotofísica

IV.2.1 – Determinação das propriedades espectroscópicas no estado estacionário para o Foscan[®] em NE e NE+DMSO 0,5 % v/v

Para um composto fotossensibilizador ser considerado um fármaco aplicável em TFD, deve-se primeiramente avaliar suas características fotofísicas e fotoquímicas que são imprescindíveis e limitantes para o emprego da terapia. O Foscan[®], entretanto, é um fotossensibilizador que possui todo um conjunto de propriedades que lhe conferiram status em fase clínica na Europa, sendo amplamente utilizado no tratamento de alguns tipos de câncer. Contudo, a associação do fármaco ao sistema de liberação em questão trata-se de um trabalho inédito, e necessita ainda, ser avaliado do ponto de vista fotofísico e fotobiológico.

Inicialmente foi determinado o perfil de absorção no UV-visível do fármaco, avaliando sua associação ao veículo de liberação desenvolvido. Utilizamos como referência uma solução do próprio composto em meio orgânico homogêneo (álcool metílico) conforme ilustra a Figura 22-A.

A emissão de fluorescência do sistema também foi avaliada a partir de excitação fixa em 430 nm, região de máxima absorção como ilustra a Figura 22-B.

Figura 22 – Espectros *normalizados* de absorção (A) e emissão (B) no uv-visível para o Foscan[®] em metanol (—), em NE (—) e NE/DMSO 0,5 % v/v (—). $\lambda_{exc} = 430$ nm, fendas de excitação/emissão ajustadas para 10 nm, 20 nm e 10 nm respectivamente. O inserto mostra o conjunto de bandas *Q* na região do vermelho entre 600 e 750 nm.

O espectro obtido em ambiente orgânico demonstra a banda de absorção *Soret* característica desta família de compostos com máximo em 415 nm e um conjunto de bandas *Q* entre 500 nm e 670 nm com máximo em 650 nm.

Para o fármaco incorporado nas formulações encontramos um perfil de absorção praticamente inalterado, verificando um discreto deslocamento batocrômico de 6 nm para a banda *Soret*, resultando assim em um máximo de absorção em 421. Analisando a região do vermelho do espectro eletromagnético verificamos que o conjunto de bandas *Q* manteve-se inalterado, apresentando uma absorção máxima localizada em 650 nm para todas as amostras.

O perfil de emissão de fluorescência foi obtido com excitação fixa em 430 nm, registrando-se as bandas de emissão características do Foscan[®] nos ambientes químicos em

estudo na faixa de 600 nm a 800 nm. Analisando a Figura 22-B, observa-se que praticamente não houve nenhuma modificação direta quanto ao perfil de fluorescência do fármaco, comparando-se com o meio orgânico homogêneo. Os espectros de emissão foram coletados utilizando-se um conjunto de fendas de emissão e excitação com ajustes de 10 nm, 20 nm e 10 nm respectivamente, registrando-se um máximo em 655 nm para todas as amostras.

A investigação destas propriedades espectroscópicas são essenciais para se justificar a utilização de um composto como agente fotossensibilizador em TFD, uma vez que os fármacos empregados nesta terapia devem obrigatoriamente possuir bandas de absorção dentro desta faixa espectral denominada “janela terapêutica” (aproximadamente entre 600 nm a 800 nm). Esta região do espectro eletromagnético garante uma maior penetração pelos tecidos biológicos, pois as interações com grupamentos cromóforos de biomoléculas, como algumas proteínas e sistemas enzimáticos, são minimizados. Várias moléculas biológicas endógenas podem absorver na região do UV-visível, como os peptídeos formados por certos aminoácidos como o triptofano, tirosina e fenilalanina, além de alguns componentes metabólicos (NADH, FAD), o DNA e grupos HEME que absorvem próximo à região do ultravioleta. No infravermelho próximo temos também a influência direta da absorção da água presente no organismo devido aos seus processos de transições vibracionais, gerando assim um efeito de competição nesta região espectral.

IV.2.2 – Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) para o Foscan[®] em meio orgânico homogêneo e em NE e NE+DMSO 0,5 % v/v

Após a absorção de um fóton de luz, uma molécula no estado fundamental (S_0) passa a popular eletronicamente o estado excitado singlete mais energético (S_n), de onde pode retornar ao seu estado fundamental (S_0) pelo processo de relaxação física conhecido como conversão interna ou através do processo radiativo de emissão de fluorescência (Diagrama de Perrin-Jablonski – Figura 4). A razão entre o número de fótons emitidos à partir do estado excitado singlete pelo processo radiativo (fluorescência) e o número total de fótons absorvidos, define um parâmetro fotofísico denominado rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) (54).

O rendimento quântico de fluorescência é um importante dado fotofísico fazendo parte de um conjunto de propriedades fundamentais para elucidar o potencial fotoquímico de uma molécula. A emissão por processos radiativos, em uma molécula orgânica, é determinada pelos rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) e de fosforescência (Φ_P). Então, se para cada fóton absorvido a molécula sofrer apenas um determinado processo fotofísico, a soma dos valores de rendimento quântico de todos os processos deve possuir um valor unitário. Se outro processo estiver em competição com aquele em análise, o rendimento quântico será menor que a unidade (1).

Desta forma, o rendimento quântico é fundamental na informação dos diversos caminhos pelos quais uma molécula excitada libera o excesso de energia. Através dos valores do rendimento quântico de fluorescência, é possível observar se uma molécula excitada foi ou não desativada por emissão de fluorescência, lembrando-se que os fármacos fotossensibilizadores mais eficientes em TFD são aqueles que apresentam um alto

rendimento quântico de produção do estado triplete excitado e baixo rendimento quântico de fluorescência.

Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) para o Foscan[®] em cada meio em estudo foram determinados através do método relativo conforme formalismo descrito por Eaton (49;50) aplicando-se a equação 10 (seção Metodologias, página 55). Foi utilizado como padrão uma solução do fármaco Foscan[®] em álcool metílico grau espectroscópico 10 μ M conforme determinado por Bonnet (15). As absorbâncias no comprimento de onda de excitação foram mantidas em aproximadamente 0,01 minimizando assim a influência da concentração das espécies que podem atuar como um filtro interno para emissão. As áreas das bandas foram determinadas a partir de espectros de emissão corrigidos.

Fez-se necessário utilizar diferentes índices de refração uma vez que o padrão utilizado foi preparado com um solvente diferente do empregado nas amostras (meio aquoso). Para o cálculo de um rendimento quântico de fluorescência é necessário que todas as condições experimentais sejam idênticas (temperatura, absorbância e equipamento) entre a solução padrão e as amostras.

Os resultados obtidos estão resumidamente apresentados na Tabela III a seguir.

Tabela III: Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) para o Foscan[®] nos diferentes ambientes químicos estudados

Amostra	Φ_F
Foscan [®] /MeOH	0,089 [*] $\pm$ 0,002
Foscan [®] /NE	0,020 $\pm$ 0,002
Foscan [®] /NE+DMSO 0,5 % v/v	0,020 $\pm$ 0,002

* Conforme determinado por Bonnet (15).

Analizando os rendimentos quânticos de fluorescência encontrados, pode-se confirmar que os mesmos permaneceram inferiores à unidade, com discreta redução após incorporação em NE e NE/DMSO. Estes resultados sugerem que nos ambientes químicos estudados, provavelmente esteja ocorrendo competições entre os processos radiativos de fluorescência e desativação por conversão interna em virtude da maior estabilização do Foscan[®] nos microambientes lipofílicos. Outro mecanismo possível seria um aumento no cruzamento entre o primeiro estado excitado singlete (S_1) e o primeiro estado excitado triplete (T_1), aumento assim a taxa de população destes níveis energéticos.

Considerando um aumento na taxa de cruzamento inter-sistemas em meio coloidal, espera-se que este fato leve a um favorecimento do potencial fotodinâmico do fármaco quando veiculado ao sistema de liberação em estudo. Este parâmetro é de fundamental importância em TFD, uma vez que a produção de espécies reativas responsáveis pelo dano ao tecido tumoral depende diretamente da formação dos transientes triplete que atuam de

forma a transferir energia ao oxigênio molecular, gerando EROS ou diretamente o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).

Outra explicação para a redução dos rendimentos quânticos seria devido a uma possível supressão parcial das espécies singlete excitadas decorrente de interações com o ambiente químico micro-heterogêneo das nanopartículas do colóide.

Na sequência deste trabalho foram realizados vários estudos fotofísicos complementares que nos deram indícios de que a primeira hipótese é a que mais se aplica aos nossos estudos.

IV.2.3 – Cinética de decaimento singlete-singlete: determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_F) para o Foscan[®] em meio orgânico homogêneo e em NE e NE+DMSO 0,5 % v/v

Para realização destes estudos cinéticos, e conseqüentemente determinação do tempo de vida das espécies singlete (τ_F), foi utilizada a técnica de contagem singular de fótons descrita na seção Metodologias do capítulo III.

O tempo de vida de um composto fluorescente representa o tempo médio que esta molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. A determinação de parâmetros em modelos cinéticos e informações relativas aos tempos de vida e distribuição do estado excitado só são possíveis através do conhecimento das taxas de decaimento do estado excitado singlete de espécies moleculares em função do tempo, obtidas através do monitoramento das curvas de decaimento de fluorescência. Assim, medidas de fluorescência resolvida no tempo podem revelar detalhes referentes às interações do fluoróforo com o ambiente químico em que se encontra (1).

Esta técnica baseia-se na excitação da amostra por um pulso de luz ou luz pulsada, sendo acionado imediatamente um sistema de detecção que mede o tempo entre o este pulso e a captação do fóton emitido pela fotomultiplicadora. Cada fóton que chega ao fotodetector é contabilizado de modo que a intensidade emitida decresça em função do tempo.

Como resultado da contagem de emissão de fótons em função do tempo, temos os histogramas como apresentado na Figura 23 a seguir.

Figura 23 – Perfil de decaimento de fluorescência para o Foscan[®] em metanol grau espectroscópico (—), em NE (—), NE/DMSO 0,5 % v/v (—), utilizando como referência a emissão da lâmpada de H_{2(g)} operando a com frequência de 40 kHz e pressão de 0,30 Bar (—).

Os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos decaimentos para cada amostra encontram-se na Tabela IV a seguir.

Tabela IV: Tempos de vida de fluorescência (τ_F) e a amplitude relativa A (proporção de cada componente) para o Foscan[®] nos meio em estudo

	τ_1 (ns)	A ₁ (%)	τ_2 (ns)	A ₂ (%)
MeOH	9,51 ± 0,634	87,4	6,65 ± 3,33	12,6
NE	8,27 ± 0,151	54,2	3,40 ± 0,104	45,8
NE + DMSO 0,5%	8,35 ± 0,159	54,5	3,37 ± 0,109	45,5

Em meio homogêneo os decaimentos de fluorescência do Foscan[®] apresentaram discreto ajuste bi-exponencial com dois tempos de vida. Percebe-se uma população de aproximadamente 12,6 % para o segundo tempo de vida. Este fenômeno pode ser explicado pela presença de espécies foto-oxidadas do Foscan[®] comumente presentes em solução alcoólica conforme descrito por Lassalle (55). Compostos fotossensibilizadores clorínicos de segunda geração possuem a características de produzir sub-produtos oxidados, presentes em pequenas quantidades, a partir da interação direta do composto com o oxigênio atmosférico e luz, em meio orgânico.

As amostras de Foscan[®] incorporado em NE e NE/DMSO apresentaram ajustes bi-exponenciais acentuados, com dois tempos de vida conforme ilustra a Tabela IV acima.

Considerando que a concentração de Foscan[®] empregada não favorece o processo de dimerização do fármaco, podemos correlacionar estes resultados à presença de duas populações distintas atribuídas à compartimentalização do mesmo em diferentes ambientes químicos da nanopartícula, bem como considerar a interação química com a membrana de surfactantes na interface óleo/água. O baixo caráter anfifílico do fármaco, mesmo que fraco, pode favorecer interações químicas do tipo não covalentes entre o composto com a parte polar (cabeça) dos surfactantes as quais ficam expostas na região externa das micelas

coloidais. A possibilidade de uma supressão estaria excluída, uma vez que a agregação do fármaco seria inexistente para baixas concentrações.

Os dados de decaimento de fluorescência para sondas incorporadas em modelos de membranas, como vesículas, micelas, etc, invariavelmente requerem ajustes bi ou tri-exponenciais devido distribuições em ambientes químicos diferenciados, sendo a concentração de cada população correlacionada com a amplitude relativa de cada espécie.

Analisando os resultados obtidos notamos que a presença do DMSO praticamente não induziu uma mudança substancial nos tempos de vida e valores de amplitude relativa, comparando-se com a formulação sem o aditivo. Estes dados sugerem que o DMSO na concentração empregada não causa influências diretas na compartimentalização do fotossensibilizador, ou seja, a presença de duas populações em ambientes distintos prevalece para a faixa de concentração do aditivo empregada.

Sendo assim, a diminuição nos tempos de vida seguida da variação nas percentagens de distribuição das populações confirmaram a incorporação efetiva do fármaco junto as regiões de menor caráter apolar das nanopartículas, além de fornecer informações sobre o ambiente químico preferencial do mesmo nas formulações.

IV.2.4 – Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_{Δ})

Dentre os estudos fotoquímicos e fotofísicos envolvendo fármacos fotossensibilizadores ativos em TFD, este fornece um parâmetro espectroscópico de grande valia para compreensão do potencial fotodinâmico do FS. A partir da determinação deste rendimento quântico podemos analisar a produção da principal espécie reativa responsável pela distribuição da célula tumoral: o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Esta espécie reativa em

conjunto com outras espécies radicalares são responsáveis por uma série de processos foto-oxidativos que ocorrem diretamente em substratos celulares e outros sítios endógenos conduzindo a morte celular através de fenômenos apoptóticos e/ou necróticos.

O rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) é um parâmetro determinado a partir da excitação de um agente fotossensibilizador, geralmente através de fotólise por pulso laser, que consecutivamente, através de um mecanismo de transferência de energia para o O_2 molecular (que por sua vez possui a mesma natureza triplete), gerando a espécie reativa 1O_2 (Figura 24). Esta espécie reativa decai para o estado fundamental a partir de processos radiativos de relaxação, emitindo um sinal característico de fosforescência em 1270 nm.

Figura 24: Diagrama de estados energéticos descrevendo os processos para produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas a partir da transição de energia entre agentes fotossensibilizadores nos estados excitados e o oxigênio molecular.

A partir do estudo da cinética desta espécie transiente podemos determinar a sua taxa de produção empregando-se um método relativo conforme descrito por Arbogast (51) discutido detalhadamente na seção de Metodologias, capítulo III.3.8.

O rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) foi determinado para as amostras de Foscan[®] em NE e NE/DMSO em ambiente saturado com O_{2(g)} grau espectroscópico. Foi utilizado como padrão uma solução etanólica de Feoforbide-a 10,0 μ M, uma bacterioclorina que possui elevado potencial de produção da espécie radicalar ($\Phi_{\Delta} = 0,59$ em EtOH) conforme descrito por DeRosa (12). Como referência empregamos uma solução do próprio fármaco em álcool metílico com rendimento quântico descrito na literatura por Bonnet. ($\Phi_{\Delta} = 0,39$ em MeOH).

A partir dos ajustes exponenciais para cada decaimento de fosforescência, foi possível determinar por extrapolação a intensidade máxima de emissão para cada amostra.

Os valores de rendimento quântico de oxigênio singlete produzido em cada ambiente químico em questão estão sumariamente apresentados na Tabela V a seguir.

Tabela V: Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) para cada amostra em estudo

Amostras	Φ_{Δ}
Feoforbide-a / EtOH*	0,59 $\pm$ 0,02
Foscan [®] / MeOH	0,39 $\pm$ 0,02
Foscan [®] / NE	0,45 $\pm$ 0,02
Foscan [®] / NE / DMSO 0,5 % v/v	0,36 $\pm$ 0,01

*utilizado como padrão para cálculo relativo dos rendimentos quânticos (56).

Relacionando os dados obtidos podemos observar que os rendimentos quânticos de oxigênio singlete para o fármaco fotossensibilizador associado à NE e NE/DMSO foram

muito semelhantes comparando-se com o meio orgânico metanólico. Este resultado é indicativo de que não houve uma supressão substancial na produção desta espécie reativa quando produzida no meio coloidal comparando-se com meio homogêneo.

Sabe-se que a associação de fármacos fotossensibilizadores em regiões lipofílicas de sistemas de liberação promove interações moleculares acentuadas que podem suprimir a população do estado excitado triplete. Tal fato não foi averiguado quando se analisa os rendimentos quânticos obtidos, uma vez que obtivemos valores bem próximos e até maiores comparados com a amostra de referência.

O rendimento quântico de oxigênio singlete é um parâmetro fotofísico que está diretamente relacionado com o ambiente químico onde é formado. O tempo de vida da espécie química é resultado do grau de capacidade difusional que lhe é submetido. Porém uma alta taxa de população do estado excitado triplete favorece uma maior taxa de transferência de energia, sendo também um fator limitante para obtenção deste produto radicalar.

Com base nos dados obtidos, pode-se considerar que a associação do fármaco ao sistema de liberação coloidal resultou em uma maior taxa de conversão intersistemas, fato este esperado, considerando uma redução do rendimento quântico singlete-singlete.

Estes resultados são de grande relevância dentro do contexto estudado uma vez que a incorporação do fármaco ao veículo de liberação desenvolvido implicou em rendimentos quânticos de oxigênio singlete dentro da faixa ideal para utilização em Terapia Fotodinâmica. Este conjunto de informações viabilizam o desenvolvimento de protocolos futuros para estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliação das interações do sistema em meio biológico.

IV.2.5 – Investigação das espécies transientes *triplete-triplete* e determinação dos tempos de vida (τ_T) gerados através de fotólise por pulso laser para o Foscan[®] nos diferentes meios em estudo

O estudo das espécies excitadas triplete é fundamental para compreender e ao mesmo tempo comprovar o comportamento fotofísico dos fotossensibilizadores utilizados na Terapia Fotodinâmica (TFD). Sabe-se que os mecanismos de fotossensibilização estão diretamente relacionados com a formação destas espécies excitadas. Conforme mostra o diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 4), tem-se que a formação das espécies reativas que induzem os danos foto-oxidativos a partir das EROS depende diretamente das transições energéticas entre o fotossensibilizador no estado excitado triplete e o substrato celular (Tipo I) e/ou oxigênio molecular (Tipo II).

Utilizando-se a técnica de fotólise por pulso de laser pode-se induzir a formação de espécies triplete obtidas a partir da absorção de energia necessária para se atingir o cruzamento intersistemas ($S_n \rightarrow T_1$). Os transientes formados foram investigados determinando-se uma cinética de decaimento que permite calcular o tempo de vida para estas espécies excitadas (T_1 , T_n).

Os decaimentos com ajustes exponenciais para as amostras de Foscan[®] em meio orgânico e incorporado em NE e NE/DMSO estão ilustrados nas Figuras 25, 26 e 27 respectivamente. Os insertos inferiores ao gráfico mostram a distribuição dos resíduos médios que indicam a qualidade do ajuste e desvio padrão para cada decaimento.

Figura 25 - Decaimento exponencial para o transiente triplete do *Foscan*[®] em álcool metílico grau espectroscópico. Inseto inferior: desvio padrão calculado dentro das mesmas escalas de decaimento ajustadas em 100 mV e 200 ns.

Figura 26 - Decaimento exponencial para o transiente triplete do *Foscan*[®] encapsulado em NE. Inseto inferior: desvio padrão calculado dentro das mesmas escalas de decaimento ajustadas em 100 mV e 200 ns.

Figura 27 - Decaimento exponencial para o transiente triplete do *Foscan*[®] encapsulado em NE contendo DMSO 0,5% v/v. Inserto inferior: desvio padrão calculado dentro das mesmas escalas de decaimento ajustadas em 100 mV e 200 ns.

As análises foram realizadas empregando-se a técnica de fotólise por pulso laser, utilizando-se um laser pulsado de ND-YAG descrito na seção equipamentos no capítulo III.2. Foi preparada uma amostra do fotossensibilizador em meio orgânico homogêneo como referência para as análises. Todas as amostras foram saturadas com $N_{2(g)}$ com objetivo de se remover todo $O_{2(g)}$ presente no meio. O oxigênio pode suprimir o estado triplete de vários compostos devido a reações de supressão, com altíssimas velocidades.

O sinal elétrico obtido foi convertido e calculado a partir da equação a seguir.

$$A(t) = \Delta DO = -\log\left(1 - \frac{I(t)}{I_0}\right) \quad (17)$$

Sendo $A(t)$ a absorbância do transiente triplete em função do tempo, $I(t)$ a intensidade de emissão de fosforescência em função do tempo pela razão da intensidade de luz incidida (I_0).

O tempo de vida τ_T foi determinado, para cada ajuste exponencial, a partir da equação 16.

$$\ln\left(\frac{A(t) - A_\infty}{A_p - A_\infty}\right) = -kt \quad (16)$$

Sendo $A(t)$ absorção para o transiente em função do tempo de decaimento, A_p absorção no máximo do decaimento, A_∞ a absorção do transiente extrapolando-se para tempo zero, k a constante de velocidade.

A partir da constante de velocidade (k), podemos calcular o tempo de vida do triplete (τ_T) para as espécies excitadas formadas, levando-se em conta a relação inversa de proporcionalidade, sendo $\tau_T = 1/k$.

Todos os dados obtidos estão apresentados na Tabela VI a seguir.

Tabela VI: Tempos de vida da espécie transiente triplete (τ_T) e amplitude relativa (A) para o fármaco fotossensibilizador Foscan[®] em cada ambiente químico estudado

Amostras	τ_1 (μ s)	A ₁ (%)	τ_2 (μ s)	A ₂ (%)
Foscan [®] /MeOH	0,35 $\pm$ 0,004	87,0	0,25 $\pm$ 0,003	13,0
Foscan [®] /NE	0,26 $\pm$ 0,002	40,5	0,33 $\pm$ 0,002	59,5
Foscan [®] /NE/DMSO 0,5% v/v	0,29 $\pm$ 0,002	100	-	-

Conforme mostra a Tabela VI, temos um ajuste bi-exponencial para o Foscan[®] em meio orgânico homogêneo (álcool metílico grau espectroscópico) com tempos de vida para a espécie triplete (τ_T) de 0,35 μ s e 0,25 μ s e populações de 87,0 % e 13,0 % respectivamente, o que concorda com o descrito na literatura (22;23). A presença de dois tempos de vida para o Foscan[®] pode estar relacionada com a formação de sub-espécies oxidadas em concentrações discretas quando na presença de luz e oxigênio. Estas espécies foram confirmadas para transições singlete-singlete em álcool metílico (55). Os subprodutos podem então estar influenciando a formação de espécies transientes triplete-triplete com tempos de vida diferenciados.

As amostras do fármaco em NE apresentaram também um ajuste bi-exponencial com dois tempos de vida (τ_T) de 0,26 μ s e 0,33 μ s com populações de 40,5 % e 59,5 % respectivamente. As espécies formadas possuem tempos de vida de mesma ordem de grandeza aproximadamente, com duas populações bem distintas justificadas pelo ajuste biexponencial característico para sistemas micro-heterogêneos (17;19;57). Estes resultados descrevem a presença do fármaco em ambientes químicos com diferentes polaridades. Com

base nestes estudos foi possível confirmar a formação do transiente triplete para o fotossensibilizador quando incorporado nas formulações.

O princípio ativo em estudo possui leve caráter anfifílico que favorece a interação química tanto em regiões apolares, no interior das micelas coloidais, quanto em regiões polares externas associando-se com as cabeças dos tensoativos. Estes dados justificam a presença do fotossensibilizador em regiões com polaridade diferenciadas, ou seja, em compartimentos distintos no interior das nanopartículas coloidais.

Para o Foscan[®] em NE/DMSO, foi possível se obter um único tempo de vida triplete (τ_T) de 0,29 μ s, justificado por um ajuste mono-exponencial para sua curva de decaimento. Percebe-se então uma influência direta do aditivo na formação dos transientes. Tal fenômeno pode ser explicado considerando-se uma possível interação em termos moleculares do DMSO na organização das micelas coloidais da emulsão. Sendo assim, o fotossensibilizador estaria interagindo diretamente em regiões de mesma polaridade, ou seja, no interior da camada de surfactantes, diferentemente da primeira amostra. Sabe-se que o DMSO possui características químicas que lhe conferem o título de promotor de penetração cutânea, uma vez que pode atuar diretamente junto às bicamadas fosfolipídicas de membranas celulares e/ou corneócitos resultando numa desorganização momentânea de tais camadas e por consequência favorece a penetração de princípios ativos e outras substâncias por vias inter e/ou intracelular (48). Pode-se então levar em consideração que tais propriedades sugerem uma interação química acentuada do aditivo nos surfactantes não iônicos responsáveis pela formação das partículas coloidais (NE). Este efeito indica que o aditivo DMSO pode estar atuando como um co-solvente nas formulações, favorecendo a

solubilidade do fármaco em ambientes de mesma polaridade, justificando assim a presença de um único tempo de vida.

Analisando de uma forma geral os resultados obtidos, foi possível concluir que o fármaco em nanoemulsão ocupa ambientes químicos distintos comparando-se com a formulação modificada com DMSO.

Avaliando estes dados podemos justificar de forma direta a formação dos transientes triplete para o ativo incorporado ao sistema de liberação, demonstrando o potencial de formação destas espécies de grande importância dentro dos mecanismos que levam ao dano fotodinâmico de degeneração celular.

IV.2.6 – Determinação dos espectros de absorção no UV-vis para as espécies transientes triplete geradas por fotólise por pulso laser para o Foscan[®] nos ambientes químicos em estudo

Os espectros de absorção do transiente triplete foram detectados a partir de fotólise por pulso de laser, utilizando-se o mesmo sistema laser Nd-YAG descrito anteriormente, ajustado no terceiro harmônio em 355 nm como fonte de excitação.

Todas as medidas foram realizadas em ambientes degaseados com N_{2(g)} espectroscópico, garantindo-se a remoção do oxigênio molecular, sob temperatura ambiente e agitação controlada.

Varreu-se o espectro UV/visível de 300 a 800 nm, coletando-se o perfil de absorção triplete-triplete para o fármaco fotossensibilizador em álcool metílico grau espectroscópico, NE e NE/DMSO, como mostra as Figuras 28 a 30.

Figura 28 - Espectro de absorção do transiente triplete-triplete obtido para o Foscan[®] meio orgânico homogêneo após excitação por pulso de laser com comprimento de onda de 355nm, com cinética monitorada 10 ns após fotoexcitação. A figura mostra uma absorção máxima em 420 nm, e o fotobranqueamento característico em 400 nm e 630 nm. O inserto corresponde ao espectro de absorção do fármaco no UV-visível em mesmo ambiente químico.

Figura 29 - Espectro de absorção do transiente triplete-triplete obtido para o Foscan[®] incorporado em NE após excitação por pulso de laser com comprimento de onda de 355nm, com cinética monitorada 79 ns após fotoexcitação. A figura mostra uma absorção máxima em 440 nm, e o fotobranqueamento característico em 420 nm e 650 nm. O inserto corresponde ao espectro de absorção do fármaco no UV-visível em mesmo ambiente químico.

Figura 30 - Espectro de absorção do transiente triplete-triplete obtido para o Foscan[®] incorporado em NE/DMSO após excitação por pulso de laser com comprimento de onda de 355nm, com cinética monitorada 17 ns após fotoexcitação. A figura mostra uma absorção máxima em 440 nm, e o fotobranqueamento característico em 420 nm e 650 nm. O inserto corresponde ao espectro de absorção do fármaco no UV-visível em mesmo ambiente químico.

A partir desta técnica foi possível obter os espectros de absorção para as espécies tripletes formadas tanto em ambiente químico homogêneo quanto em heterogêneos coloidais.

Para o meio orgânico temos máximos de absorção em 420 nm, com fotobranqueamentos característicos em 400 nm e 630 nm respectivamente, confirmando a baixa taxa de absorção de fótons pela espécie transiente nesse comprimento de onda. Este fenômeno é explicado devido uma competição com o composto no estado fundamental que possui bandas de absorção exatamente nessa região espectral, como ilustra o inserto na figura.

Em meio coloidal, verificamos um máximo de absorção em 440 nm tanto para o fármaco em NE quanto em NE/DMSO. Foi perceptível um discreto deslocamento

batocrômico, comparando-se com meio orgânico, já verificado para as bandas do fotossensibilizador no estado fundamental, sugerindo uma melhor estabilização do FS em meio organizado devido melhor solvatação.

Com estes resultados foi possível confirmar a absorção característica do transiente triplete na região do visível do espectro eletromagnético além do fotobranqueamento esperado na região de maior absorção de fótons no estado fundamental, conforme ilustra os insertos das figuras.

A partir destes resultados pode-se confirmar a formação dos transientes triplete para o fármaco quando incorporado aos sistemas de liberação. Estas informações são fundamentais para se afirmar que a associação ao veículo não ocasionou mudanças consideráveis ao potencial fotofísico do fármaco, fato este confirmado inicialmente por outros parâmetros previamente determinados.

Portanto, a incorporação do Foscan[®] às NE foi realizada com sucesso, resultando em um sistema com propriedades físico-químicas e fotofísicas que lhe garantem status para aplicação em ensaios *in vitro* e *in vivo* dentro da Terapia Fotodinâmica do câncer.

IV.3 – Avaliação *in vitro* em modelo animal

A tecnologia farmacêutica, nos últimos tempos, vem contribuindo intensivamente no tratamento do câncer de pele com o desenvolvimento de sistemas de liberação para aplicação dermatológica em TFD-tópica e/ou transdérmica (37;38;58).

Esta modalidade da TFD vem atraindo grande interesse por parte de diversos pesquisadores (57;59-61) resultando em diversas vantagens farmacológicas em fase clínica. Alguns pontos como praticidade, ausência de efeitos adversos, liberação sustentada, além de eficácia comprovadamente potencializada, em certos casos, confirmam as vantagens e estimulam o desenvolvimento das pesquisas científicas em TFD-tópica.

Um sistema de liberação com *design* para aplicação tópica deve necessariamente ser submetido a uma sequência de ensaios *in vitro* que vêm avaliar diretamente a interação da formulação com a pele através de protocolos que descrevem a permeação e retenção pelas camadas da pele. Estes testes podem fornecer valiosas informações a respeito da influência de diferentes formulações na liberação de fármacos, permitindo uma modulação desta propriedade através de experimentos sistemáticos em condições biomiméticas.

IV.3.1 – Determinação de um método analítico para quantificação do fármaco Foscan[®] nos ensaios *in vitro* de permeação e retenção cutânea

Inicialmente, fez-se necessário o desenvolvimento de um método analítico padrão para quantificação do ativo nos experimentos *in vitro* de permeação e retenção cutânea em pele de animal.

Partindo-se do princípio de que o fármaco fotossensibilizador Foscan[®] possui um espectro de emissão de fluorescência definido, foi empregada tal propriedade fotofísica como ferramenta analítica viável para quantificação nos ensaios subseqüentes.

Primeiramente foi preparada uma solução estoque do fotossensibilizador na concentração de 50 μ M em metanol grau espectroscópico, sendo armazenada em *freezer* sob condições estáveis de temperatura.

Com auxílio de um conjunto de microseringas de 10 μ L e 50 μ L, foi preparada uma série de soluções por diluições sucessivas, com concentrações conhecidas. Para cada solução traçaram-se os espectros de emissão de fluorescência fixando-se as mesmas condições experimentais que levam em conta parâmetros espectroscópicos que devem ser mantidos constante durante todas as análises.

Para todas as medidas, foram utilizados um conjunto de fendas de excitação/emissão com aberturas de 10 nm, 20 nm e 10 nm respectivamente. O comprimento de onda de excitação foi de 430 nm, com tempo de integração de 0,1 s e 1 cm de caminho óptico em celas de quartzo para emissão, sob agitação magnética controlada e temperatura ambiente.

Foram traçadas curvas padrão de calibração para os meios utilizados nas etapas experimentais *in vitro*. Para a determinação do perfil de permeação cutânea foi utilizado como meio receptor uma solução salina de tampão fosfato 10,0 mM, pH 7,4, com etanol 20 % v/v. Para extração do ativo retido nas camadas da pele foi utilizado diretamente metanol (grau analítico) sem tratamento prévio. As curvas padrão de calibração determinadas para os dois meios em questão estão ilustradas nas Figuras 31 e 32 a seguir.

Figura 31 - Curva padrão de calibração para quantificação do Foscan[®] em álcool metílico grau espectroscópico. Equação: $y = 2748343x + 39147$, $R^2 = 1,00$.

Figura 32 - Curva padrão de calibração para quantificação do Foscan[®] em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, 20 % etanol. Equação: $y = 436226x + 45353$, $R^2 = 0,99$.

Foram medidas as intensidade de emissão de fluorescência em 655 nm com excitação fixa em 430 nm para cada espectro. Correlacionando-se a intensidade máxima em

função da concentração do princípio ativo, foi possível estabelecer uma relação linear que permitiu o cálculo da equação linear a partir dos pontos experimentais. As curvas experimentais apresentaram uma linearidade dentro dos padrões necessários para se estabelecer um método analítico padrão, possuindo desvios quadráticos médios próximos à unidade. Portanto, foi confirmada uma tendência linear dos pontos em função da concentração crescente do composto.

As curvas padrão foram empregadas em todos os procedimentos de estudo *in vitro* realizados posteriormente.

IV.3.2 – Determinação do perfil de permeação cutânea do Foscan[®] em NE e NE/DMSO 0,5 % v/v

Os experimentos de permeação cutânea *in vitro* foram realizados conforme descrito na seção Metodologias, capítulo III.3.2.3.

A quantidade do fármaco permeada através da pele de orelha de porco foi calculada em função da razão da quantidade de ativo na solução receptora por área de aplicação tópica determinada pelo diâmetro da célula de Franz. Estes valores foram relacionados graficamente em função do tempo de aplicação das amostras determinando-se assim o fluxo difusional pelos tecidos (J).

Na Figura 33 temos os perfis de permeação cutânea para o Foscan[®] em solução fisiológica comumente utilizada em protocolos clínicos de TFD-tópica (24;53;62) e quando incorporado nas formulações estudadas (NE e NE/DMSO).

Figura 33 - Perfil de permeação cutânea *in vitro* do Foscan[®] associado em NE (●), em NE/DMSO 0,5 % v/v, (■), e em solução tampão fosfato pH 7,4 (▲). Os resultados representam a média de cinco medidas para cada ponto.

Os resultados indicam um perfil crescente da quantidade permeada de Foscan[®] em função do tempo para praticamente todas as amostras. Entretanto, temos uma taxa de permeação tecidual nitidamente maior observada para as formulações nanoestruturadas.

A incorporação do fotossensibilizador aos sistemas coloidais resultou em um fluxo difusional aproximadamente 10 vezes maior, comparando-se com a solução fisiológica, como observado na Tabela VII a seguir.

Os fluxos difusionais foram calculados na região linear da curva, ou seja, a partir da sexta hora após aplicação tópica, tempo este denominado *Lag-time* ou tempo necessário para se minimizar o efeito do gradiente de concentração do fármaco pelas camadas dos tecidos, verificando assim uma concentração constante através da pele. O *Lag-time* também

indica o tempo necessário após aplicação tópica para se atingir uma linearidade entre a quantidade de ativo e o tempo, aumentando de forma diretamente proporcional.

Tabela VII: Dados de permeação cutânea *in vitro* para o Foscan[®] determinados após 12 h de aplicação tópica

Amostra	Fluxo (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Retenção 12 h [derme + epiderme] ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Tempo de Latência – T. L. (h)
Tampão Fosfato	1,20	$0,650 \pm 0,11$	5,9
NE	17,2	$0,114 \pm 0,04$	5,9
NE + DMSO 0,5%	11,5	$1,068 \pm 0,23$	5,9

O aumento na concentração de fotossensibilizador no meio receptor após 12 horas de aplicação tópica evidencia uma melhor penetração tecidual quando incorporado ao sistema de liberação, sugerindo assim uma maior concentração do fármaco nas camadas mais internas da pele. Os surfactantes presentes na formulação das NE atuam como eficientes promotores de permeação cutânea, devido sua interação com os fosfolipídios que constituem as camadas do extrato córneo e corneócitos. O poder anfifílico de tais compostos conduz a um maior fluxo de fármaco entre as camadas da pele, seja por via intracelular ou intercelular. O aumento da concentração de ativo permeado garante assim uma absorção celular mais eficiente e por sua vez uma maior eficácia fotodinâmica quando irradiado.

Os altos fluxos de permeação encontrados podem favorecer diretamente a redução da concentração do ativo na formulação, direcionando para uma modulação da quantidade

de fármaco administrada. Este fato resulta na minimização de efeitos de citotoxicidade muito comuns em aplicações através de formulações convencionais em TFD-tópica.

É fato que sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos possuem inúmeras vantagens comparando-se com veículos tradicionais (31;32;63;64). Tais vantagens estão relacionadas com uma maior interação tecidual, consequência da ampliação da área superficial aliada ao tamanho reduzido que leva a uma melhor biocompatibilidade com substratos biológicos.

O aumento na taxa de permeação observado nestes ensaios *in vitro* caracteriza uma importante vantagem relacionada ao acúmulo do fotossensibilizador nas camadas mais internas da pele, demonstrando uma viabilidade quanto ao uso deste sistema em terapia fotodinâmica de câncer de pele, podendo ser confirmada por ensaios *in vivo* e estudos de epiderme viável.

Considerando que veículo desenvolvido consiste de uma emulsão do tipo óleo em água, temos que grande parte do ativo foi solubilizado pela parte lipofílica do mesmo, facilitando sua partição para as camadas internas da pele, que por sua vez possuem certa afinidade química, ou seja, de mesma polaridade.

O dimetil-sulfóxido é um clássico promotor de permeação cutânea, utilizado em diferentes formulações dentro da faixa de concentração limite de 10 % a 20 % v/v devido suas limitações tóxicas (47;48;48). Analisando a Tabela VI, temos que a taxa de permeação do sistema com este aditivo foi discretamente menor, apesar de ser bem maior comparando-se com a solução fisiológica. Este resultado pode ser melhor compreendido considerando que o DMSO na faixa de concentração de 0,5 % v/v interagiu quimicamente com os

tensoativos alterando as propriedades da formulação, o que pode favorecer uma maior interação lipídica e maior acúmulo tecidual. Outra consideração plausível seria a atuação do aditivo como um co-solvente na formulação. Sendo assim, teríamos uma competição entre os ambientes químicos de maior polaridade do veículo e co-solvente.

O tempo de latência encontrado nos sugere um intervalo ideal no qual teríamos um *up-take* celular favorecido em meio biológico e, além disso, um indicativo como tempo ideal para se iniciar o processo de irradiação laser em fase de protocolos clínicos *in vivo*.

IV.3.3 – Determinação do perfil de *retenção cutânea* dos sistemas Foscan[®]/NE e Foscan[®]/NE/DMSO 0,5 % v/v após 12 horas de aplicação tópica

Dentro da sistemática de desenvolvimento de uma formulação para aplicação tópica/transdérmica, é fundamental o estudo e a avaliação do perfil de retenção cutânea. Através desta técnica podemos investigar o acúmulo do fármaco nas camadas teciduais, bem como determinar diretamente a quantidade de ativo presente nas regiões do estrato córneo e camadas mais profundas como epiderme e derme. Estes ensaios são muito úteis quando se necessita averiguar a quantidade de fármaco retida em função do tempo, o que pode ser muito interessante para se modular uma faixa de concentração e tempo adequados para estudos dermatológicos e desenvolvimento de terapias de administração tópica.

Os protocolos experimentais utilizados estão descritos na seção Metodologia do capítulo III.

A partir da extração por fitas, também denominada *tape stripping* como descrito anteriormente, foi possível realizar a quantificação do ativo retido no estrato córneo e

epiderme/derme de pele de porco seguindo-se os protocolos estabelecidos em modelo animal.

Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 34 a seguir relatando a quantidade de fármaco em função do meio avaliado após 12 horas de aplicação tópica.

Figura 34: Perfil de retenção cutânea nas camadas da pele para o Foscan[®] nos seguintes meios em estudo: NE (■), NE/DMSO 0,5 % v/v (■) e em solução fisiológica pH 7,4 (■).

Como mostra os dados ilustrados na Figura 34, pode-se considerar que uma quantidade de fármaco de aproximadamente 0,4 µg/cm² permaneceu retida no estrato córneo após 12 horas de aplicação tópica. Com base nestes dados pode-se afirmar que para

todas as amostras foi encontrada uma retenção característica verificando assim a penetração do ativo pela barreira do estrato córneo para todos os meios.

Contundo, analisando as camadas da epiderme/derme notamos uma taxa de retenção para o sistema Foscan[®]/NE/DMSO um pouco maior comparando-se com as outras amostras em estudo. Os resultados relatam uma quantidade de aproximadamente 0,5 µg/cm² de fármaco retido nas camadas mais profundas da pele, monitorado dentro do intervalo de tempo fixado. O favorecimento do perfil de retenção do ativo para a formulação modificada com DMSO deve estar diretamente correlacionado com o efeito co-solvente do aditivo na formulação, como presenciado na determinação do fluxo difusional.

Pode-se concluir que, após 12 horas de administração, grande parte do fármaco foi eliminada dos tecidos, resultado do alto fluxo transdérmico proporcionado pela NE.

Portanto, verificamos que a adição do composto DMSO na formulação resultou em uma maior taxa de retenção do fármaco, alterando diretamente a liberação *in vitro* do fotossensibilizador.

IV.3.4 – Avaliação da influência da concentração de DMSO na permeação e retenção cutânea do sistema Foscan[®]/NE

Considerando que a presença do aditivo dimetil-sulfóxido ocasionou uma influência direta em certas propriedades das NE, direcionamos esta etapa experimental para uma avaliação *in vitro* da concentração do mesmo na formulação em estudo.

Utilizando-se o mesmo método de obtenção, foram preparadas três amostras de NE com 0,5 %, 5,0 % e 10,0 % v/v de DMSO com concentração fixa de FS em 0,1 mg/mL.

Para se determinar o perfil de permeação das amostras junto às camadas da pele foi empregado o mesmo protocolo utilizando-se o sistema de difusão por células de Franz com controle de temperatura de agitação.

As amostras foram aplicadas topicamente em série de quintuplicada para cada formulação, sendo coletadas alíquotas de solução receptora em intervalos de 1 hora num total de 12 horas de experimento. O perfil experimental obtido para cada meio está ilustrado na Figura 35 a seguir.

Figura 35 – Avaliação da influência da concentração de DMSO na permeação cutânea *in vitro* do sistema Foscan[®]/NE. Amostras: DMSO 0,5 % v/v (●), DMSO 5,0 % v/v, (▲) e DMSO 10,0 % (■).

As curvas de permeação cutânea para cada amostra em função do tempo foram determinadas relacionando-se a quantidade de fármaco permeado por cm² de pele.

A partir do coeficiente angular da parte inclinada de cada curva (entre 6 e 12 horas), determinamos o fluxo ou velocidade de permeação transdérmica (J) para o ativo nos meios em estudo bem como o tempo de latência para o equilíbrio difusional como descrito por De Rosa (47). Os parâmetros calculados estão apresentados na Tabela VIII a seguir.

Tabela VIII: Coeficientes difusionais de permeação cutânea *in vitro* para o fármaco em diferentes formulações após 12h de aplicação tópica

Formulação	Fluxo (J) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)
NE/DMSO 0,5 %	11,3
NE/DMSO 5,0 %	7,50
NE/DMSO 10,0 %	6,40

O fluxo de permeação (J) está diretamente relacionado com os coeficientes de partilha do veículo, ou seja, sua capacidade de interação com ambientes químicos favoráveis por semelhança de polaridade. A permeação cutânea é governada por processos difusionais, sendo estes responsáveis pelo transporte do fármaco através das membranas da pele e justificados físico-quimicamente pela segunda Lei de Fick (Equação 5).

A partir dos dados obtidos podemos observar um fluxo de permeação decrescente para as amostras em função da concentração crescente de DMSO.

Esperava-se um aumento no fluxo de fármaco permeado em função de concentrações crescentes do aditivo. Os fluxos difusionais encontrados (J) apresentaram razões 3 e 4 vezes menores para as formulações com 5,0 % e 10,0 % de DMSO respectivamente, em comparação com a formulação 0,5% v/v. Estes dados indicam existir

uma influência direta do aditivo na cinética difusional do fármaco pelas camadas da pele, resultando em uma diminuição substancial da velocidade de permeação do fotossensibilizador. A partir da técnica de *Tape Stripping* foi possível determinar o perfil de retenção cutânea para o fotossensibilizador incorporado nas diferentes formulações, avaliando cada camada tecidual. Na Figura 36 temos a relação da quantidade de fármaco em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de pele extraído diretamente do estrato córneo e epiderme/derme após 12 horas de aplicação tópica.

Figura 36 – Avaliação da influência da concentração de DMSO na retenção cutânea “*in vitro*” do sistema Foscan[®]/NE. As amostras foram extraídas do tecido após 12 horas de aplicação tópica. (■) estrato córneo e (■) epiderme+derme.

Os resultados demonstram um decréscimo na quantidade de FS retido nas camadas do tecido em função da concentração crescente de DMSO na formulação.

Confirma-se, portanto, que concentrações elevadas do aditivo favorecem a diminuição da retenção cutânea do FS nos meios estudados. Este fenômeno indica que o aditivo neste ambiente químico passa a desenvolver uma função que não está relacionada

com a promoção de permeação, podendo estar diretamente relacionada com a atuação do mesmo apenas como co-solvente para o Foscan[®].

Nas camadas mais profundas, epiderme e derme, ficou caracterizada uma retenção menor ainda em função da concentração crescente de DMSO.

O acúmulo de fármaco tanto no estrato córneo como nas camadas inferiores do tecido está diretamente relacionado com uma melhor eficiência fotodinâmica em terapias de neoplasias cutâneas que estão localizadas diretamente nessas regiões da pele.

Entretanto, analisando a formulação com 0,5% v/v, esta apresentou um perfil de retenção consideravelmente maior comparando-se com o meio na ausência do aditivo, como previamente observado nos resultados anteriores. Este resultado indica uma vantagem ao se utilizar concentrações menores de DMSO, sugerindo o emprego de tal composto com concentração modulada em razões iguais ou menores que 0,5 % v/v.

Portanto, determinamos que faixas de concentrações elevadas de DMSO inviabilizam sua aplicação direta como um “promotor de permeação cutânea” — fato que não impede sua utilização em baixas concentrações, o que favorece uma melhor retenção.

Em TFD-tópica a utilização da formulação preparada com baixa concentração de DMSO pode ser considerada favorável, uma vez que houve um maior acúmulo do FS em função do tempo, e por consequência, uma possível indução de maior dano fotoinduzido direcionado diretamente nas regiões mais profundas da pele.

V – Conclusão

Os estudos físico-químicos demonstraram que o sistema Foscan[®]/NE possui uma morfologia com dimensões nanoestruturadas na ordem de 250 nm determinadas por espectroscopia de fotocorrelação.

O monitoramento do diâmetro hidrodinâmico em função do tempo permite afirmar que os sistemas desenvolvidos possuem alta estabilidade termodinâmica, condizente com as características fundamentais necessárias para desenvolvimento de um DDS. O tamanho médio das partículas permaneceu constante por até 9 semanas, demonstrando ser um sistema monodisperso suficientemente estável, confirmado pelas curvas de distribuição com baixíssima polidispersividade.

As propriedades espectroscópicas foram determinadas com sucesso, sendo possível caracterizar vários parâmetros essenciais ao desenvolvimento de um DDS para aplicação em TFD. Os dados indicam que as propriedades fotofísicas do fármaco fotossensibilizador foram praticamente mantidas quando incorporado as NE.

A espectroscopia no estado estacionário demonstrou que o perfil de absorção do FS foi praticamente inalterado, o qual apresenta um conjunto de bandas de transição eletrônica entre 600 e 750nm, estando dentro da região de interesse do espectro eletromagnético visível. A capacidade do mesmo de atuar como um bom fluoróforo permaneceu constante com emissão de fluorescência em 655 nm quando associado ao DDS, podendo ser empregado em estudos de fotodiagnóstico.

Os rendimentos quânticos de fluorescência Φ_F encontrados sugerem uma diminuição na taxa de população nos estados excitados singlete, para as amostras de Foscan[®]/NE e Foscan[®]/NE/DMSO, comparando-se com meio orgânico homogêneo. Estes dados fotofísicos podem sugerir uma maior taxa de cruzamento intersistemas, favorecendo a formação da população do estado excitado tripleto, espécie química necessária para se induzir os mecanismos fotodinâmicos para regressão tumoral.

A espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo foi capaz de demonstrar que o FS em estudo possui dois tempos de vida com populações distintas, ocupando regiões de polaridade diferenciada quando associado ao DDS. Foi possível se atestar a compartimentalização do ativo em regiões lipofílicas e hidrofílicas das nanopartículas coloidais como resultado da encapsulação efetiva do fármaco.

Os estudos de fotólise por pulso laser comprovaram a formação das espécies transientes triplete para o fármaco fotossensibilizador no ambiente químico em estudo, as quais possuem tempos de vida da ordem do μ s. Foi possível também a detecção do espectro de absorção dos transientes triplete, verificando-se máximos de absorção em 440 nm com fotobranqueamento característicos na região de máxima absorção no estado fundamental. A comprovação da presença destas espécies excitadas está diretamente relacionada com um potencial fotodinâmico do FS.

Foram também determinados por fotólise pulsada os rendimentos quânticos de produção de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) em ambiente coloidal, que ficaram na ordem de 0,45 e 0,36 respectivamente para os sistemas NE e NE/DMSO 0,5 % v/v. Estes dados demonstram uma taxa de produção desta espécie excitada mais do que suficiente para se desencadear as reações radiculares responsáveis pelos processos de foto-oxidação dos substratos biológicos.

Portanto, os estudos físico-químicos e espectroscópicos contribuíram para elucidar detalhadamente vários parâmetros importantes para compreensão do sistema desenvolvido. De modo geral, foi possível concluir que o DDS desenvolvido possui propriedades físico-químicas e fotofísicas interessantes, que garantem e permitem a continuidade dos estudos a partir de investigações *in vitro* e *in vivo*, visando o direcionamento à aplicações clínicas em TFD-tópica.

Os ensaios *in vitro* de permeação e retenção cutânea em modelo animal demonstraram o perfil de permeação do fármaco incorporado as NE, possibilitando o cálculo dos fluxos difusionais pela pele. Foi demonstrado também que o sistema favoreceu

uma cinética de permeação relativamente muito superior quando comparada às formas de administrações convencionais. A retenção após 12 horas de experimento demonstrou que o perfil de acúmulo do fármaco esta de acordo com o esperado para DDS topicamente administrados, sendo eliminado gradualmente em função do tempo.

A formulação modificada com DMSO 0,5 % v/v apresentou uma maior taxa de acúmulo tecidual, comparando-se com outras formulações, na ausência ou com concentrações elevadas do aditivo.

Avaliando-se a influência do DMSO nas formulações, conclui-se uma atuação direta do mesmo como co-solvente para o FS, inativando, de certa forma, suas características como promotor de “permeação cutânea” para o sistema estudado.

Portanto, este conjunto de dados fornecem parâmetros mais do que suficientes para classificar a formulação desenvolvida como promissor DDS aplicável em TFD-tópica. Os resultados *in vitro* dão margem à continuidade dos estudos, favorecendo a realização de ensaios *in vivo* que podem elucidar ainda mais o potencial deste sistema no tratamento de neoplasias cutâneas a partir de protocolos clínicos de TFD.

VI – Referências Bibliográficas

1. LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 2.ed. Baltimore, Maryland: Kluwer Academic, 1999.
2. DOUGHERTY, T. J. Photodynamic Therapy (PDT) of malignant tumors. **CRC Critical Reviews of Oncology/Hematology**, v.2, p.83-116, 1984.
3. DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy: yearly review. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.58, p.895-900, 1993.
4. SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova**, v.25, n.5, p.801-07, 2001.

5. SOBOLEV, A. S.; JANS, D. A.; ROSENKRANZ, A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. **Progress in Biophysics e Molecular Biology**, v.73, p.51-90, 2004.
6. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**, v.54, p.4151-202, 1998.
7. TEDESCO, A. C. et al. Determination of binding constant (Kb) of biocompatible ferrite-based magnetic fluids to serum albumin. **Journal Applied Physicals**, v.93, p.6704-06, 2003.
8. FOOTE, C. S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.54, p.659, 1991.
9. GOMER, C. J. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.34, p.1093-107, 1991.
10. BACHOR, R. et al. Photosensitized destruction of human bladder carcionoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres. **Proceendings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.88, p.1580-84, 1991.
11. SCHIMIDT-ERFURTH, U. et al. Photodynamic therapy of experimental choroidal melanoma using lipoprotein-delivered benzoporphyrin. **Ophthalmology**, v.101, p.89-99, 1994.
12. DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v.233-234, n.1, p.351-71, 2002.
13. BONNETT, R. Photosensitizers of the Porphyrins and Phtalocyanine Series for Photodynamic Therapy. **Chemical Society Reviews**, v.60, p.19-33, 1995.

14. ALI, H.; VAN LIER, J. E. Metal Complexes as Photo- and Radiosensitizers. **Chemical Society Reviews**, v.99, p.2379-450, 1999.
15. BONNETT, R.; BERENBAUM, M. Porphyrins as photosensitizers. **Ciba Foundation Symposium**, v.146, p.40-53, 1989.
16. GOMES A. J. **Obtenção, caracterização e avaliação de micropartículas de PLGA contendo indocianina e bacterioclorofila-a como sistemas de liberação de fármacos na terapia fotodinâmica.** Tese Doutorado, FFCLRP - USP, Ribeirão Preto, 2003.
17. GOMES C. N. L. **Estudos sinérgicos de novos derivados de ftalocianina de zinco contendo grupamentos quelantes para íons cálcio aplicados na Terapia Fotodinâmica: avaliação fotofísica e fotobiológica.** Tese Doutorado, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, 2004.
18. NUNES S. M. T. **Uso Potencial de LDE e Microesferas de Albumina como sistemas liberadores de ftalocianinas e clorinas ativas na Terapia Fotodinâmica de neoplasias.** Dissertação Mestrado, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, 2003.
19. NUNES S. M. T. **A potencialidade do uso de diferentes sistemas de liberação de fármacos na Terapia Fotodinâmica: Preparação e estudos Fotofísicos.** Tese Doutorado, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, 2003.
20. TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. **Current Organic Chemistry**, v.7, p.187-96, 2003.
21. MIRONOV, A. F.; NECHAEV, A. V. The directed modification of the pyrrole ring D in natural chlorins. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.27, p.120-23, 2001.

-
22. BONNETT, R. et al. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)-porphyrin (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacterio-chlorin (m-THPBC): a comparative study. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions**, v.2, p.325-28, 1998.
23. BONNETT, R. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy - Chlorins and Bacteriochlorins. In: **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**. Advanced Chemistry Texts .ed. London: Gordon and Breach Science Publishers, 2000. v.1, cap.9,p. 176-197.
24. BIEL, M. A. Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancer. **Current Oncology Reports**, v.4, p.87-96, 2002.
25. BELITCHENKO, I. et al. Characterization of photodegradation of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) in solution: biological consequences in human tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.67, n.5, p.584-90, 1998.
26. HADJUR, C. et al. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin(m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of single oxygen by m-THPC. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.45, p.170-78, 1998.
27. RIS, H. B. et al. Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: initial clinical results. **British Journal of Cancer**, v.64, n.6, p.1116-20, 1991.
28. RIS, H. B. et al. Absence of rhodamine 123-photochemotoxicity in human tumor xenografts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.13, n.1, p.40-44, 1993.

29. DELAEY, E. et al. A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.55, p.27-36, 2000.
30. KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.66, p.89-106, 2001.
31. SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, p.1-20, 2000.
32. LENAERTS, V. et al. Nanocapsules with a Reduced Liver Uptake: Targeting of Phthalocyanines to EMT-6 Mouse Mammary Tumor in vivo. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v.41, n.1995, p.38-43, 1994.
33. HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.1, p.22-30, 2004.
34. PATRI, A. K.; MAJOROS, I. J.; BACKER JR, J. R. Dendritic Polymer Macromolecular Carriers for Drug Delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.6, p.466-71, 2002.
35. JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, v.66, p.115-26, 1999.
36. SARIKAYA, M. et al. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. **Nature Materials**, v.2, p.577-85, 2003.
37. SHIM, J. et al. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymers nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v.97, p.477-84, 2004.

-
38. ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v.99, p.53-62, 2004.
 39. VAN HERRIKHUIZEN, J. et al. Fractal-like Self-Assembly of Oligo(p-phenylene vinylene) Capped Gold Nanoparticles. **Journal of American Chemistry Society**, v.128, n.3, p.686-87, 2005.
 40. WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity — *in vivo* study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.56, p.67-72, 2003.
 41. YAMAGUCHI, Y. et al. Successful treatment of photo-damaged skin of nano-scale atRA particles using a novel transdermal delivery. **Journal of Controlled Release**, v.104, p.29-40, 2004.
 42. YAMAMOTO, H. M. et al. Direct Formation of Micro-/Nanocrystalline 2,5-Dimethyl-N,N'-dicyanoquinonediimine Complexes on SiO₂/Si Substrates and Multiprobe Measurement of Conduction Properties. **Journal of American Chemistry Society**, v.128, n.3, p.700-01, 2005.
 43. FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3th.ed. São Paulo: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, ed. Rothschild, 2003.
 44. OLIVEIRA, A. G. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v.27, n.1, p.131-38, 2003.
 45. HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Biotechnology applied in drug delivery systems development: microemulsion and nanoemulsions. **Nature**, v.152, p.102, 1943.
 46. SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M. **Journal of Physical Chemistry**, v.63, p.1677, 1959.

47. DE ROSA, F. S. et al. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo photoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. **Journal of Controlled Release**, v.65, n.2000, p.359-66, 1999.
48. WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration Enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.2004, p.603-18, 2003.
49. DEMAS, J. N.; CROSBY, G. A. Measurement of photoluminescence quantum yields. **Journal of Physical Chemistry**, v.75, p.991-1024, 1971.
50. EATON, D. F. Reference Materials for Fluorescence Measurement. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v.60, n.7, p.1107-14, 1988.
51. ARBOGAST, J. Photophysical Properties of C60. **Journal of Physical Chemistry**, v.95, p.11, 1991.
52. D'CRUZ, A. K.; ROBINSON, M. H.; BIEL, M. A. m-THPC Mediated Photodynamic Therapy in Patients with Advanced, Incurable Head and Neck Cancer: A Multicenter Study of 128 Patients. **Head & Neck**, p.201-72, Março, 2004.
53. HOPPER, C.; NIZIOL, C.; SIDHU, M. The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. **Oral Oncology**, v.40, n.4, p.372-82, 2003.
54. TURRO, N. J. **Modern Molecular Photochemistry**. Mill Valey, CA: University Science books, 1991

-
55. LASSALE H. P. **Etude des mécanismes du photoblanchiment de la 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bactéριοchlorine, em solution, in vitro et in vivo.** Tese Doutorado, Université Henri Poincaré-Nancy I, França, 2005.
56. YANG, H. et al. An investigation of the triplet state of Pheophorbide-a using laser flash photolysis. **Dyes and Pigments**, v.46, p.139-43, 2000.
57. VENA F. C. B. **Estudo da potencialidade do 5-ALA, derivados e fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica do câncer de pele: uso do gel de monoleína como sistema de liberação de fármacos.** Tese Doutorado, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, 2005.
58. DE ROSA, F. S. et al. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v.89, p.261-69, 2003.
59. FISCHER, F.; MAIER-BORST, W.; LORENZ, W. J. Photodynamic therapy as a tool for suppressing the haematogenous dissemination of tumour cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology: B**, v.43, n.1, p.27-33, 1998.
60. HILL, R. A. et al. Photodynamic therapy of ocular melanoma with bis silicon 2,3-naphthalocyanine in a rabbit model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.36, n.12, p.2476-81, 1995.
61. HOPFNER, M. et al. Hypericin activated by an incoherent light source has photodynamic effects on esophageal cancer cells. **International Journal of Colorectal Disease**, v.18, n.3, p.239-47, 2003.
62. COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled Drug Delivery with Nanoparticles: Current Possibilities and Trends Future. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v.41, n.1995, p.2-13, 1994.

63. TABOSA DO EGITO, YU. W. et al. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v.89, p.139-46, 1993.

“Estas Referências Bibliográficas foram elaboradas utilizando-se os parâmetros da *ABNT — Associação Brasileira de Normas Técnicas*”