UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência do ultrassom de baixa frequência associado à hidrogéis na permeabilidade da pele e no tratamento tópico do câncer de pele

Tatiana Aparecida Pereira

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência do ultrassom de baixa frequência associado à hidrogéis na permeabilidade da pele e no tratamento tópico do câncer de pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientado(a): Tatiana Aparecida Pereira

Orientador(a): Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Tatiana Aparecida

Influência do ultrassom de baixa frequência associado à hidrogéis na permeabilidade da pele e no tratamento tópico do câncer de pele. Ribeirão Preto, 2015.

156p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Lopez, Renata Fonseca Vianna

1. Ultrassom de baixa frequência. 2. Nanopartículas lipídicas sólidas. 3. Câncer de pele. 4. Regiões de transporte localizado. 5. Doxorrubicina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tatiana Aparecida Pereira

Influência do ultrassom de baixa frequência associado à hidrogéis na permeabilidade da pele e no tratamento tópico do câncer de pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Resumo

PEREIRA, T.A. **Influência do ultrassom de baixa frequência associado à hidrogéis na permeabilidade da pele e no tratamento tópico do câncer de pele.** 2015. 156f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O câncer de pele é uma doença com grande incidência mundial. O tratamento tópico do câncer de pele é uma estratégia desejada uma vez que pode diminuir os efeitos adversos graves causados pelo tratamento cirúrgico e quimioterapia sistêmica. No entanto, os tratamentos tópicos atuais são limitados pela baixa efetividade das formulações em carrear o fármaco até as camadas mais profundas da pele. Desta forma, o ultrassom de baixa frequência (LFU) apresenta-se como um método atrativo, mas ainda pouco estudado, para aumentar a permeabilidade da pele. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar modificações na composição dos meios de acoplamento do LFU visando aumentar as regiões de transporte localizadas (LTRs) da pele e a permeabilidade do quimioterápico doxorrubicina (DOX) para o tratamento tópico do câncer de pele. Para isso, um hidrogel de Poloxamer (nanogel) enriquecido com nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo DOX foi preparado e caracterizado; diferentes meios de acoplamento, dentre eles os tradicionais, contendo tensoativo, e os inovadores, contendo as NLS ou hidrogéis com diferentes potenciais zeta e viscosidades semelhantes, foram avaliados associados ao LFU para verificar sua influência na formação das LTRs e penetração cutânea de dois fármacos, calceína e DOX; a penetração cutânea da DOX livre e encapsulada em NLS foi quantificada nas diferentes camadas da pele pré-tratada com LFU; e, finalmente, o pré-tratamento mais promissor, LFU associado ao nanogel, seguido da aplicação passiva da DOX incorporada no nanogel foi avaliada *in vivo* em tumores cutâneos induzidos em camundongos imunossuprimidos. As NLS apresentaram tamanho e PdI de aproximadamente 200 nm e 0,3 respectivamente, com alto potencial zeta catiônico e pH de 3. A incorporação das NLS no nanogel não alterou o tamanho e PdI, no entanto, diminuiu o potencial zeta da formulação e elevou o pH para 5,5. Verificou-se por difração de raios X a baixo ângulo que as NLS continham fases cristalinas lamelares, enquanto o nanogel, fases cristalinas cúbicas, que foram mantidas quando as formulações foram associadas. O uso das NLS e dos hidrogéis, incluindo o nanogel, como meio de acoplamento do LFU modificou consideravelmente a distribuição e número de LTRs na pele em relação aos meios tradicionais. Tanto o número de LTRs quanto a sua distribuição parecem estar relacionados à tensão interfacial e a viscosidade do meio hidrofílico, sendo que a maior viscosidade dos géis gerou maior área de LTRs. O uso do nanogel originou LTRs em 50% da área da pele tratada, área esta 24 vezes maior do que a área de LTRs formada quando o meio de acoplamento convencional, com lauril sulfato de sódio, foi utilizado. Observou-se que a influência das LTRs na penetração de fármacos aniônicos (calceína) e catiônicos (DOX) depende do potencial zeta do hidrogel usado como meio de acoplamento e da dissociação do fármaco. Desta forma, a permeação cutânea da calceína foi menor quando gel aniônico foi utilizado como meio de acoplamento e o inverso ocorreu para a DOX. A penetração da DOX através do estrato córneo da pele pré-tratada com LFU/nanogel aumentou mais de 4 vezes, mas a encapsulação da DOX nas NLS dificultou a passagem da DOX para as camadas mais profundas da pele após o pré-tratamento da mesma com LFU, sugerindo um recuperação da pele desestruturada pelas partículas lipídicas administradas após o pré-tratamento. Nos estudos *in vivo*, o pré-tratamento da pele com LFU/nanogel seguido da aplicação diárias do nanogel contendo DOX resultou em diminuição de 6 vezes do volume do tumor após 21 dias de tratamento e apenas 5 aplicações do LFU/nanogel. No entanto, a diminuição do volume do tumor só ocorreu quando a sonda do LFU foi posicionada a 10 mm da superfície do tumor. O posicionamento da sonda a uma distância mais próxima do tumor (5 mm) não diminuiu o tamanho do tumor. Conclui-se que a aplicação de LFU com hidrogéis como meio de acoplamento é uma alternativa simples e efetiva para aumentar a penetração de fármacos na pele. Esta penetração pode ser modulada em função do potencial zeta do meio de acoplamento e da posição da sonda do ultrassom em relação à superfície do tumor. Desta forma, o tratamento tópico do câncer de pele usando LFU/nanogel como pré-tratamento é uma estratégia promissora para o tratamento tópico do câncer de pele.

Palavras chave: ultrassom de baixa frequência, nanopartículas lipídicas sólidas, câncer de pele

Abstract

PEREIRA, T.A. **Influence of low frequency ultrasound associated with hydrogels on the skin permeability and in topical skin cancer treatment.** 2015. 156f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Skin cancer is a disease with high worldwide incidence. Topical treatment of skin cancer is a desired strategy since it can reduce the serious adverse effects caused by surgery and systemic chemotherapy. However, current topical treatments are limited by low effectiveness of the formulations delivery drug to the deeper layers of the skin. Thus, the low frequency ultrasound (LFU) presents itself as an attractive method, but still little studied, to increase skin permeability. Therefore, the objective of this work was to study changes in the LFU coupling medium composition to increase the transport localized region (LTRs) in the skin and the permeability of chemotherapeutic doxorubicin (DOX) for the topical skin cancer treatment. For this, a Poloxamer hydrogel (nanogel) supplemented with solid lipid nanoparticles (SLN) containing DOX was prepared and characterized; different coupling medium, including traditional, containing surfactant, and innovative, containing the NLS or hydrogels with different viscosities and zeta potential similar, were evaluated associated with the LFU to verify its influence in LTRs formation and skin penetration of two drugs, calcein and DOX; skin penetration of free and encapsulated DOX was quantified in the different layers of the LFU pretreated skin; and finally, the most promising pretreatment, LFU associated with nanogel, followed by the passive application of DOX incorporated into the nanogel was evaluated in vivo, in skin tumors induced in immunosuppressed mice. The NLS showed size and PDI of approximately 200 nm and 0.3, respectively, with high cationic zeta potential and pH 3 value. The incorporation of the NLS into the nanogel did not change the size and PDI, however, decreased the zeta potential of the formulation and increased pH value to 5.5. It was found by low angle X-ray diffraction that NLS-containing lamellar crystalline phase while the nanogel, cubic crystalline phases, which were maintained when the formulations were associated. The use of NLS and hydrogels, including nanogel, as coupling medium of LFU substantially modify the distribution and number of the LTRs in the skin compared to traditional medium. Both, LTRs number and distribution may be related to the interfacial tension and viscosity of the hydrophilic medium, hydrogel with higher viscosity produced greater LTRs area. The use of nanogel as coupling medium resulted in LTRs formation in 50% of treated skin area, this area is 24 times larger than the LTR area LTRs formed when conventional coupling medium sodium lauryl sulfate was used. It was observed that the influence of the LTRs in the penetration of anionic drugs (calcein) and cationic (DOX) depends on the zeta potential of the hydrogel used as coupling medium and drug. Thus, the permeation of calcein was lower when anionic gel was used as the coupling medium and the opposite occurred for DOX. DOX penetration through the stratum corneum of the skin pretreated with LFU / nanogel increased more than 4 times but the encapsulation of DOX in the NLS difficult the passage of DOX to the deeper layers of the skin after pre-treatment with LFU, suggesting the recovery of the skin by lipid particles administered after pretreatment. In the in vivo study, pretreatment of the skin with LFU / nanogel followed by the daily application of nanogel containing DOX resulted in a 6-fold decrease in tumor volume after 21 days of treatment with only 5 applications LFU / nanogel. However, the reduction of tumor volume occurred only when the LFU probe was positioned 10 mm from the tumor surface. The positioning of the probe at distance closer tumor (5 mm) has not decreased tumor size. It is concluded that the application of coupling medium hydrogels with LFU is a simple and effective alternative to enhance drug penetration into the skin. This penetration can be adjusted depending on the zeta potential of the coupling means and ultrasound probe position on the tumor surface. Therefore, topical treatment of skin cancer using LFU / nanogel as pre-treatment is a promising strategy for the topical treatment of skin cancer.

Key words: Low frequency ultrasound, solid lipid nanoparticles, skin cancer.

Lista de Figuras

Figura 1:	Representação das camadas da pele: epiderme, derme e tecido subcutâneo.....	3
Figura 2:	Estrutura da epiderme e diferenciação dos queratinócitos.....	4
Figura 3:	Representação esquemática da parede de tijolos, impermeável, resultante da organização dos corneócitos no EC.....	5
Figura 4:	Tipos de câncer de pele. A) carcinoma de células basais superficial, B) carcinoma de células escamosas e C) câncer de pele tipo melanoma.....	6
Figura 5:	Estimativa do número de novos casos dos tipos mais comuns de câncer para os anos de 2014 e 2015.....	6
Figura 6:	Resultado cosmético da cirurgia de carcinoma de células escamosas de tumor localizado na região da cabeça e pescoço.....	8
Figura 7:	Representação esquemática das camadas da pele com ênfase no EC: A) EC normal, em pele saudável e B) EC tumoral hiperqueratinizado..	10
Figura 8:	Vias de penetração de fármacos através do EC: A) através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular) e B) via apêndices cutâneos.....	11
Figura 9:	Representação esquemática dos diferentes sistemas nanocarreadores de fármacos. A) lipossoma, B) nanoemulsão e C) nanopartícula lipídica sólida.....	12
Figura 10:	Representação esquemática: A) NLS contendo lipídeos sólidos e B) CLN contendo uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos com cadeias carbônicas de tamanhos variados (cristais pouco organizados).....	13
Figura 11:	Classificação do som segundo o ponto auditivo do homem.....	16
Figura 12:	Representação esquemática da formação de áreas de rarefação e compressão durante a propagação do som em um determinado meio....	17

Figura 13:	Representação esquemática da amplitude e frequência da onda sonora.	17
Figura 14:	Representação esquemática da onda sonora de alta e baixa frequência.	22
Figura 15:	Representação das bolhas de cavitação dentro do EC, resultando na diminuição da função barreira da pele.....	23
Figura 16:	Representação esquemática da cavitação no meio de acoplamento com colapso assimétrico de uma bolha de cavitação levando a formação de microjatos líquidos de alta velocidade que rompem o EC.	23
Figura 17:	Representação esquemática da formação de: a) ondas de choque resultantes do processo de colapso de uma bolha de cavitação no meio de acoplamento, b) microjato líquido resultante da regressão de uma bolha próxima a superfície da pele e c) processo de regressão de uma bolha resultando na formação de microjato líquido de alta velocidade..	25
Figura 18:	Três possíveis mecanismos em função dos quais a cavitação inercial pode melhorar a permeabilidade da pele: a) ondas de choque emitidas durante o processo de colapso das bolhas de cavitação no meio de acoplamento, b) impacto de um microjato líquido na superfície do EC e c) microjatos líquidos penetrando fisicamente dentro do EC.....	26
Figura 19:	Imagem representativa de LTRs na superfície da pele de porco tratada com LFU na frequência de 20 kHz usando meio de acoplamento contendo lauril sulfato de sódio 1%. LTRs foram coradas com <i>allura red</i> . A seta indica uma LTR.....	27
Figura 20:	Diagrama esquemático do aparelho que utiliza dois transdutores de ultrassom com frequências diferentes. a) A sonda do HFU produz um grande número de pequenas bolhas que são transmitidas para o campo de ação do LFU. b) As bolhas nucleadas pelo HFU vão crescer sob a influência do LFU. c) Ao aproximar-se da pele, as bolhas começam a oscilar de forma não linear e colapsar na direção da superfície da pele, formando os microjatos líquidos.....	35
Figura 21:	Diagrama pseudo-ternário parcial do sistema ácido esteárico/CTAB: monoleína/ água.....	41
Figura 22:	Aparato para calibração do US por calorimetria.....	49

Figura 23:	<i>Tape stripping</i> do EC para quantificação da DOX retirada nesta camada da pele.....	53
Figura 24:	Pré-tratamento da pele <i>in vivo</i> utilizando LFU/nanogel.....	55
Figura 25:	Diagrama pseudo-ternário do sistema ácido esteárico/CTAB/monoleína/água. corresponde a área de microemulsão, corresponde a área onde mesofases líquido-cristalinas foram observadas.....	58
Figura 26:	Cromatogramas das combinações da DOX com os componentes das NLS: A) DOX + CTAB, B) DOX + ácido esteárico, C) DOX + monoleína, D) DOX + CTAB + ácido esteárico, E) DOX + CTAB + monoleína, F) DOX + ácido esteárico + monoleína, G) NLS + DOX (mistura física), H) NLS-DOX e I) NLS branca.....	63
Figura 27:	Coeficiente de partição da DOX a partir de NLS-DOX e da solução de DOX, utilizando clorofórmio e acetato de etila como fase apolar e água como fase polar. A DOX apresenta coloração vermelha em solução. Nenhum dos componentes da NLS apresenta coloração, exceto a DOX.....	67
Figura 28:	Morfologia das NLS observada por microscopia de força atômica (A) topografia e (B) imagem de fases. As setas indicam as NLS-DOX.....	68
Figura 29:	Perfil de distribuição do tamanho das NLS obtido por PCS. A) NLS-DOX em água, B) nanogel NLS-DOX e C) gel de poloxamer sem NLS.....	70
Figura 30:	Imagens de microscopia eletrônica de varredura: A) NLS-DOX, B) nanogel e C) nanogel NLS-DOX. As setas indicam as nanopartículas presentes na matriz do gel.....	71
Figura 31:	Microscopia de luz polarizada das formulações: A) Nanogel de poloxamer 407 20% (p/v), B) NLS-DOX, C) Nanogel NLS-DOX a 25°C (aumento de 10x) e D) Nanogel NLS-DOX a 25°C aumento de 32x.....	73

Figura 32:	Difratograma obtido a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS) das NLS e NLS-DOX.....	74
Figura 33:	Difratograma obtido a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS) do nanogel e nanogel-NLS.....	76
Figura 34:	Difratograma obtido a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS) do nanogel-NLS e nanogel-NLS-DOX.....	77
Figura 35:	Velocidade de cisalhamento [1/s] versus tensão de cisalhamento [Pa] obtidos 24 horas após o preparo das formulações: A) nanogel e B) nanogel NLS-DOX.....	79
Figura 36:	Quantidade de DOX liberada a partir de diferentes formulações em 26 horas.....	80
Figura 37:	Velocidade de cisalhamento [1/s] versus tensão de cisalhamento [Pa] obtidos 24 horas após o preparo das formulações: A) nanogel de poloxamer e B) hidrogel de Carbopol, C) hidrogel de HEC e D) hidrogel de quitosana.....	84
Figura 38:	Tensão interfacial dos hidrogéis utilizados como meio de acoplamento. A análise estatística foi realizada utilizando One-way ANOVA seguida pelo post test Tukey (n=3) (GraphPad Prism versão 5.0). *p <0,05 vs PBS + SLS 1%, ** p <0,05 vs PBS + CTAB 0,33%, *** p <0,05 vs SLN, **** p <0,05 vs nanogel, # p <0,05 vs hidrogel de HEC, + p <0,05 vs hidrogel de carbopol.....	86
Figura 39:	% de área de pele ocupada pelas LTRs após tratamento da pele com LFU e diferentes meios de acoplamento. A análise estatística foi realizada utilizando One-way ANOVA seguida pelo post test Tukey (n=10) (GraphPad Prism versão 5.0). *p <0,05 vs PBS + SLS 1%.....	88
Figura 40:	Imagem representativa da pele tratada simultaneamente com LFU e diferentes meios de acoplamento. A Imagem Nativa indica a área da pele que foi tratado com LFU e expostas ao corante allura red, a imagem ajustada para quantificação indica o limite da imagem ajustada para quantificação e área quantificada indica área de LTRs	

	quantificada pelo software <i>imagem J</i>	89
Figura 41:	Quantidade de DOX retida no EC (A) e na epiderme viável (B) após o pré-tratamento da pele com LFU e os diferentes meios de acoplamento. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados usando teste T Student não pareado (one tailed). * $p<0.05$ vs passivo, ** $p<0.05$ vs PBS + SLS 1%, *** $p<0.05$ vs NLS, **** $p<0.05$ vs nanogel + NLS e # $p<0.05$ vs PBS + CTAB 0,33%.	96
Figura 42:	Quantidade de DOX retida no EC (A) e na epiderme viável (B) após o pré-tratamento da pele com LFU e diferentes meios de acoplamento a partir do nanogel NLS-DOX. Os estudos foram conduzidos utilizando os mesmos parâmetros de LFU para os diferentes meios de acoplamento. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados usando teste T Student não pareado. * $p<0.05$ vs passivo, ** $p<0.05$ vs PBS + SLS 1%, *** $p<0.05$ vs NLS, **** $p<0.05$ vs nanogel + NLS e # $p<0.05$ vs PBS + CTAB 0,33%.....	100
Figura 43:	Quantidade de DOX retida no EC (A) e na epiderme viável (B) após o pré-tratamento da pele com LFU e os diferentes géis hidrofílicos (gel catiônico: quitosana, gel não-iônico: HEC, gel aniônico: Carbopol). Os estudos foram conduzidos utilizando os mesmos parâmetros de LFU para os diferentes meios de acoplamento. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados de acordo com o método de análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. * $p<0.05$ vs hidrogel aniônico, ** $p<0.05$ vs hidrogel de catiônico.....	102
Figura 44:	Calceína permeada através da pele, <i>in vitro</i> , após pré-tratamento com LFU e diferentes hidrogéis como meio de acoplamento: (i) nanogel (não iônico), (ii), hidrogel de quitosana (gel catiônico) e (iii) hidrogel de Carbopol (gel aniônico). Os estudos foram conduzidos utilizando os mesmos parâmetros de LFU para os diferentes meios de acoplamento. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=5). Os resultados foram analisados de acordo com o método de análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey,	

	com $p < 0.05$ como nível mínimo de significância.....	105
Figura 45:	Imagens da pele pré-tratada com LFU/nanogel. Condições experimentais: intensidade $9,6 \pm 0,5 \text{ W/cm}^2$, ciclo de trabalho 5s ON, 5s OFF, tempo de cada pré-tratamento 1 minuto, sonda a 3 mm da superfície da pele. As setas indicam o local da lesão.....	108
Figura 46:	Imagens representativas da pele de camundongos sem pelo pré-tratada com LFU/nanogel. Condições experimentais: intensidade $9,6 \pm 0,5 \text{ W/cm}^2$, sonda distante 3 mm da superfície da pele em (A) e 5 mm em (B), (C) e (D), ciclo de trabalho 5s ON, 5s OFF, tempo de cada ciclo: A) 30 s, B) 20 s, C) 10, D) 5 s.....	109
Figura 47:	Crescimento tumoral após tratamento tópico: A) sem pré-tratamento com LFU: (■) grupo controle, o qual não recebeu qualquer tipo de tratamento, (▼) aplicação tópica do nanogel contendo DOX. B) pré-tratamento com LFU/nanogel seguido da aplicação do nanogel contendo DOX: (■) grupo controle, (▲) sonda posicionada à 5 mm de distância da superfície da pele (●) sonda posicionada à 10 mm de distância da superfície da pele. * $p < 0.05$ vs. controle. Analizado por teste T Student não pareado (one tailed).....	111

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Características físico-químicas das Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	59
Tabela 2:	Influência da proporção CTAB:monoleína nas características físico-químicas das NLS obtidas a partir da mistura ácido esteárico/CTAB:monoleína/água (40/20/40).....	60
Tabela 3:	Características físico-químicas das NLS compostas por ácido esteárico/CTAB:monoleína (1:2)/água (40/20/40) obtidas com diferentes concentrações de DOX.....	62
Tabela 4:	Eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC) das NLS contendo DOX preparadas a partir de diferentes concentrações de DOX.....	65
Tabela 5:	Características físico-químicas da dispersão de NLS-DOX e do nanogel NLS-DOX.....	69
Tabela 6:	Dados obtidos a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS): vetor de espalhamento (q), distância interplanar (d), razão entre a distância interplanar de dois picos, parâmetro de rede (a) e estrutura cristalina das formulações NLS e NLS-DOX.....	75
Tabela 7:	Dados obtidos a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS): vetor de espalhamento (q), distância interplanar (d), razão entre a distância interplanar de dois picos, parâmetro de rede (a) e estrutura cristalina das formulações nanogel e nanogel-NLS...	76
Tabela 8:	Dados obtidos a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS): vetor de espalhamento (q), distância interplanar (d), razão entre a distância interplanar de dois picos, parâmetro de rede (a) e estrutura cristalina das formulações nanogel-NLS e nanogel NLS-DOX.....	78
Tabela 9:	Caracterização físico-química dos meios de acoplamentos utilizados no pré-tratamento da pele com LFU.....	83
Tabela 10:	Viscosidade aparente dos hidrogéis com diferentes concentrações de polímero obtida à taxa de cisalhamento de 30 (1/s).....	84

Tabela 11:	Tensão interfacial dos meios de acoplamento utilizados no pré-tratamento da pele com LFU.....	86
Tabela 12:	Resultados da medida da resistividade elétrica da pele <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> para avaliação da efetividade do protocolo de medida da resistividade da pele <i>in vivo</i> . Pele pré-tratada com LFU/nanogel na intensidade $9,6 \pm 0,5 \text{ W/cm}^2$, ciclo de trabalho 5 s ON, 5 s OFF por 1 min, distância da sonda do LFU da superfície da pele de 3 mm, tratada até aproximadamente $1 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$	108
Tabela 13:	Tempo e número de ciclos (5 s ON, 5 s OFF) de aplicação do LFU/nanogel necessários para causar lesão na pele de camundongos sem pelo.....	109

Lista de Abreviaturas e Siglas

DOX	Doxorrubicina
EC	Estrato córneo
LFU	Ultrassom de baixa frequência
<i>CPNM</i>	Câncer de pele não melanoma
<i>CCE</i>	Carcinoma de células escamosas
QA	Queratose actínica
<i>CCB</i>	Carcinoma de células basais
FDA	Food and Drug Administration
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
CLN	Carreador lipídico não estruturado
HFU	Ultrassom de alta frequência
LTR	Regiões de transporte localizado
SLS	Lauril sulfato de sódio
PBS	Tampão fosfato pH 7.4
ME	Microemulsão
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
PdI	Índice de polidispersividade
HEC	Hidroxietilcelulose

Sumário

Resumo	I
Abstract.....	II
Lista de Figuras	III
Lista de Tabelas	IX
Lista de Abreviaturas e Siglas	XI
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	3
2.1. A pele e o câncer de pele	3
2.2. Penetração de fármacos na pele	10
2.2.1.Nanopartículas lipídicas sólidas como estratégia para aumentar a penetração de fármacos na pele.....	11
2.2.2.Ultrassom de baixa frequência como estratégia para aumentar a penetração de fármacos na pele.....	16
2.2.2.1. Mecanismos do LFU	19
2.2.2.2. Mecanismos não-cavitacionais.....	20
2.2.2.3. Cavitação	21
2.2.2.4. Vias de permeação na pele: <i>regiões localizadas de transporte (localized transport regions – LTRs)</i>	26
2.2.2.5. Sinergismo do LFU com promotores de permeação químicos e físicos	28
2.2.2.6. Aplicações de LFU: liberação de macromoléculas e nanopartículas	33
3. Objetivo	37
3.1. Objetivos específicos	37
4. Material e Métodos	38
4.1. Material.....	38
4.1.1. Pele.....	38
4.1.2. Animais de laboratório	39
4.2. Métodos	39
4.2.1. Quantificação da DOX por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	39
4.2.2. Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) pelo método da Microemulsão (ME)	40
4.2.2.1. Determinação da razão entre os componentes necessária para a formação da microemulsão	40
4.2.2.2. Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas	41

4.2.2.3. Efeito da proporção de tensoativo/co-tensoativo nas características físico-químicas das NLS.....	42
4.2.2.4. Obtenção das NLS contendo DOX (NLS-DOX)	42
4.3. Caracterização das NLS	42
4.3.1. Tamanho médio, PdI e Potencial Zeta das dispersões de NLS	42
4.3.2. Microscopia de força atômica (MFA)	42
4.3.3. Análise da interação da DOX com os componentes da formulação	43
4.3.4. Coeficiente de partição da DOX e da NLS-DOX	43
4.3.5. Determinação da quantidade total e porcentagem de perda do fármaco na NLS ...	43
4.3.6. Eficiência de Encapsulação (%EE)	44
4.3.7 Capacidade de carga (%CC)	45
4.4 Obtenção de hidrogel enriquecido com a dispersão aquosa de NLS-DOX (nanogel NLS-DOX)	45
4.5. Caracterização do nanogel	46
4.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
4.5.2. Microscopia de luz polarizada.....	46
4.5.3. Difração de raios X a baixo ângulo (SAXS)	46
4.5.4. Análise reológica.....	47
4.6. Estudos <i>in vitro</i> de liberação da DOX a partir das NLS-DOX, do nanogel NLS-DOX e do nanogel-DOX.....	47
4.7. Pré-tratamento da pele usando ultrassom de baixa frequência - (LFU).....	48
4.7.1. Preparo da pele	48
4.7.2. Medida de resistividade elétrica da pele (R)	48
4.7.3. Pré-tratamento da pele com US.....	49
4.7.4. Meios de acoplamento utilizados no pré-tratamento da pele com LFU.....	50
4.7.5. Imagem digital e análise da área das regiões localizadas de transporte (<i>localized transport regions</i> - LTRs)	51
4.8. Estudos de permeação cutânea da DOX	52
4.8.1. Estudos de retenção da DOX na pele	52
4.9. Estudos de permeação cutânea da calceína.....	53
4.10. Estudos <i>in vivo</i>	54
4.10.1. Padronização do tempo de pré-tratamento da pele <i>in vivo</i> usando LFU/nanogel .	54
4.10.2 Indução tumoral em camundongos nude balb/c imunossuprimidos.....	55
4.10.3.Tratamento tópico do carcinoma de células escamosas com DOX após pré-tratamento com LFU/nanogel.....	56

4.11. Análise estatística	57
5. Resultados e Discussão.....	58
5.1. Obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas	58
5.2. Efeito da proporção de CTAB:monoleína nas características físico-químicas das NLS	60
5.3 Obtenção e caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas com Doxorubicina ..	61
5.4. Obtenção de hidrogel enriquecido com a dispersão aquosa de NLS-DOX (nanogel NLS-DOX).....	68
5.4.1 Estudos de microscopia eletrônica de varredura	71
5.4.2. Análise por microscopia de luz polarizada	72
5.4.3. Estudos de difração de raios X a baixo ângulo (SAXS)	74
5.5. Análise reológica	79
5.6. Estudos <i>in vitro</i> de liberação da DOX a partir das NLS-DOX, do nanogel NLS-DOX e do nanogel-DOX.....	80
5.7. Pré-tratamento da pele usando ultrassom de baixa frequência - (LFU).....	81
5.7.1. Imagem digital e análise da área das regiões localizadas de transporte (<i>localized transport regions</i> - LTRs)	88
5.8 Estudos de permeação cutânea da DOX	95
5.8.1 Influência de diferentes meios de acoplamento na permeação da DOX.....	95
5.8.2 Influência de diferentes meios de acoplamento na permeação da NLS-DOX.....	99
5.8.3 Influência do potencial zeta dos meios de acoplamento compostos por géis na permeação da DOX	102
5.8.4. Estudos de permeação cutânea da calceína	104
5.9. Estudos <i>in vivo</i> com LFU/nanogel em tumores cutâneos	106
5.9.1. Padronização do tempo de pré-tratamento da pele <i>in vivo</i> usando LFU/nanogel .	107
5.9.2. Tratamento tópico do carcinoma de células escamosas usando LFU/nanogel e DOX	110
6. Conclusão	114
7. Referências bibliográficas	115
8. Anexos.....	138
8.1. Documento de aprovação do comitê de ética para realização dos testes <i>in vivo</i>	138

1. Introdução

O câncer de pele, principalmente o do tipo não melanoma, é uma doença de ampla incidência global, com taxas que vem aumentando a cada ano, representando um enorme problema de saúde pública. Entre os tratamentos disponíveis, a cirurgia e a quimioterapia sistêmica, associados ou não, estão entre os de primeira escolha. No entanto, esses tratamentos levam a uma série de efeitos colaterais graves, o que resulta em uma diminuição da adesão do paciente ao tratamento. O tratamento tópico do câncer de pele é um método atrativo que atualmente é limitado pela ineficiência das formulações existentes em carrear o antineoplásico até as camadas mais profundas da pele, onde os tumores cutâneos se encontram, em quantidade e profundidade suficiente.

Utilizando a doxorrubicina (DOX) como antineoplásico hidrofílico modelo para o tratamento tópico de tumores sólidos, diversas estratégias já foram estudadas para aumentar sua penetração cutânea: o promotor de absorção monoleína aumentou a penetração da DOX no estrato córneo (EC), mas a molécula não difundiu para as camadas mais profundas da pele (Herai et al., 2007). Esta interação da DOX com o EC foi diminuída com a aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade, a iontoforese, que aumentou a penetração cutânea do fármaco (Taveira et al., 2009). Mas, mesmo assim, uma alta porcentagem da DOX continuou retida no EC. A DOX foi então encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) na tentativa de proteger o fármaco, diminuindo sua interação com o EC. De fato, as NLS aumentaram a permeação cutânea da DOX até a epiderme viável, além de contribuírem para uma maior citotoxicidade do fármaco frente à cultura de células tumorais (Taveira et al., 2014). Desta forma, estima-se que a utilização de técnicas que desorganizem o EC, facilitando a penetração não só do fármaco mas também de componentes da formulação ou do próprio sistema de liberação, possa contribuir para a maior entrega da DOX diretamente para as células tumorais distribuídas nas camadas profundas da pele.

O ultrassom de baixa frequência (LFU) tem sido amplamente estudado nos últimos 20 anos e tem mostrado resultados satisfatórios em aumentar a penetração de fármacos na pele, principalmente os hidrofílicos e macromoléculas, através da cavitação acústica transiente que ocorre no meio de acoplamento durante a aplicação do LFU (Polat et al., 2011). No entanto, apesar dos grandes esforços realizados com o intuito de aperfeiçoar o tratamento da pele utilizando o LFU, a desestruturação que ele causa na superfície da pele quando aplicado ainda mostra-se heterogênea e cobrindo uma pequena porcentagem da área tratada (cerca de 5 a 10 % da área total da pele exposta ao LFU) (Polat et al., 2011). Ainda, quando a

área desestruturada é aumentada (aproximadamente 27% da área total da pele exposta ao LFU), faz-se necessário a utilização de equipamentos que tornam difícil sua aplicação clínica, sendo necessário o investimento em dispositivos adequados para tal uso (Schoellhammer et al., 2012).

Portanto, é de grande interesse o desenvolvimento de estratégias para a aplicação do LFU que sejam clinicamente mais simples, ou seja, de fácil aplicação e que mostrem potencial para permeabilizar grandes áreas da pele e permitir o tratamento tópico, por exemplo, do câncer de pele.

Baseado no exposto acima, nós estimamos que modificações na composição do meio de acoplamento do LFU sejam capazes de alterar a nucleação das bolhas de cavitação, com consequente implicação na energia liberada no colapso dessas bolhas. Desta forma, alterações na cavitação podem resultar em uma área de desestruturação maior e mais homogênea da superfície da pele, aumentando a efetividade do tratamento tópico usando LFU por resultar em um maior aumento na permeabilidade da pele.

Desta forma, neste trabalho avaliou-se a influência de diferentes meios de acoplamento na permeabilidade da pele e na penetração cutânea e tumoral da DOX usando LFU. Dentre os meios utilizados, NLS e hidrogéis foram investigados pela primeira vez em associação ao LFU. A aplicação do LFU em tumores cutâneos induzidos em camundongos imunossuprimidos também foi estudada seguida da administração tópica da DOX. Esta proposta de tratamento constitui uma abordagem inovadora e propiciou resultados estimulantes de regressão tumoral *in vivo*.

2. Revisão de Literatura

2.1. A pele e o câncer de pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 16% do total da massa corporal. Ela é organizada em duas camadas principais; a epiderme e a derme, seguida por uma camada de tecido adiposo subcutânea, a hipoderme. A epiderme é a camada mais externa da pele e consiste, de maneira geral, de quatro estratos distintos, sendo eles o estrato córneo (EC), granuloso, espinhoso e basal (Figura 1) (Ribeiro, 2010).

Figura 1: Representação das camadas da pele: epiderme, derme e tecido subcutâneo.

Fonte: Aula de Anatomia (2015).

Os estratos granuloso, espinhos e basal constituem a epiderme viável, com aproximadamente 50 a 100 μm de espessura, enquanto o EC, com espessura de aproximadamente 10 a 20 μm , constitui a epiderme não viável. Cada estrato exibe um estágio sequencial de diferenciação dos queratinócitos, que são as células mais abundantes da epiderme. Os queratinócitos são originários do estrato basal, de onde eles transitoriamente migram para o EC e são liberados a partir da superfície da pele por um processo denominado descamação (Figura 2). O estrato basal também possui melanócitos (Figura 2), que produzem e distribuem os grânulos de melanina para os queratinócitos.

Figura 2: Estrutura da epiderme e diferenciação dos queratinócitos.

Fonte: Adaptado de D'Orázio et al. (2013).

Durante a migração dos queratinócitos do estrato basal para o córneo, processo referido como diferenciação celular, os queratinócitos se achatam e adotam as dimensões que são características das células mortas do EC, os corneócitos, que são os produtos finais da diferenciação dos queratinócitos (Figura 2). Os queratinócitos do estrato granuloso contêm um número elevado de grânulos revestindo a membrana, referidos como corpos lamelares, onde lipídeos como a glicosilceramida, esfingomielina e fosfolipídeos são armazenados. Por meio da exocitose, o conteúdo lipídico dos corpos lamelares é liberado juntamente com enzimas hidrolíticas no espaço intercelular, na interface estrato granuloso/EC. Esses lipídeos são precursores dos lipídeos do EC, e são enzimaticamente processados em seus produtos finais, as ceramidas e os ácidos graxos que, juntamente com o colesterol, são os principais lipídeos encontrados no EC. O EC humano contém de 10 a 25 camadas de corneócitos orientadas paralelamente à superfície da pele e embebidas na matriz lipídica (Swartzendruber et al., 1987, Elias, 1983, Lazo et al., 1995).

A estrutura do EC é muitas vezes referida como uma parede impermeável de tijolos ligados por cimento, onde os tijolos representam os corneócitos e a matriz lipídica é representada pelo cimento (Figura 3). Os corneócitos são compostos por água e queratina macrofibrilar encapsuladas por um envelope corneificado composto por uma rede densamente empacotada de proteínas. Existe ainda uma camada de lipídeos não polares, referida como envelope lipídico, localizada na porção externa do envelope corneificado. O envelope córneo

em conjunto com o envelope lipídico minimiza a absorção de uma grande parte de substâncias (Downing, 1992, Meguro et al., 2000, Behne et al., 2000).

Figura 3: Representação esquemática da parede de tijolos, impermeável, resultante da organização dos corneócitos no EC.

Fonte: Pharmazeutische PZ Zeitung online (2015).

Na epiderme viável ainda são encontradas as células de Langerhans, que são células apresentadoras de antígenos responsáveis pela resposta imune na pele (McGrath ; Uitto, 2010).

A derme está subjacente a epiderme. Nessa camada encontram-se estruturas cutâneas como vasos sanguíneos, folículos pilosos, nervos, glândulas sebáceas e sudoríparas (Figura 1). A derme também contém células do sistema imunológico e fibroblastos, que participam ativamente em muitas respostas fisiológicas (Ribeiro, 2010).

Devido à heterogeneidade da pele, a ampla variedade de tipos de células que a compõe pode gerar diversos tipos de tumores, sendo eles malignos ou benignos.

O câncer de pele é o tipo mais comum de câncer que afeta a população branca, com mais de um milhão de novos casos detectados a cada ano (Geller; Annas, 2003, D'Orázio et al., 2013). O câncer de pele pode ser classificado em carcinoma de células basais (*CCB*) e carcinoma de células escamosas (*CCE*); ambos referidos como câncer de pele não melanoma (*CPNM*); e o melanoma cutâneo maligno (*MC*) (Figura 4). Essa classificação é feita de acordo com a célula de origem e o comportamento clínico do tumor de pele (Armstrong; Kricker, 2001; Narayanan; Saladi, 2010, D'Orázio et al., 2013).

Figura 4: Tipos de câncer de pele. A) carcinoma de células basais superficial, B) carcinoma de células escamosas e C) câncer de pele tipo melanoma.

Fonte: INCA (2015).

Entre os tumores de pele malignos, o *CPNM* é o de maior incidência (Figura 5), e sua ocorrência tem aumentado de 3 a 8% anualmente desde 1960, representando hoje cerca de 95% de todas as neoplasias cutâneas (Rubin; Chen; Ratner, 2005, Dubas; Ingraffea, 2013). Ele acomete com frequência partes do corpo que são comumente mais expostas ao sol como orelhas, face, pescoço e antebraços, sendo raramente letal. No Brasil, estimou-se para o ano de 2014 182.000 novos casos de *CPNM*, o que equivale a 31,5 % do total de novos casos (Figura 5). A estimativa é válida para o ano de 2015 (INCA, 2015).

Figura 5: Estimativa do número de novos casos dos tipos mais comuns de câncer para os anos de 2014 e 2015.

Fonte: INCA (2015).

O *CCE* corresponde a aproximadamente 20% de todos os casos de *CPNM*, sendo o segundo tipo de câncer mais comum na população branca (Dubas; Ingraffea, 2013). O *CCE* se desenvolve tipicamente em áreas da cabeça e pescoço expostas ao sol, incluindo couro cabeludo, as orelhas, terço médio da face, lábio inferior e pescoço (Madan; Lear; Szeimies, 2010).

Sendo uma neoplasia maligna de queratinócitos, as lesões de *CCE* mostram displasia celular que pode acometer toda a espessura da epiderme. *CCE* pode surgir como uma nova lesão ou em alguns casos, estar associado a lesões precursoras como a queratose actínica (*QA*) ou a pré-malignidades como a doença de Bowen (Dubas; Ingraffea, 2013). *QA* é uma neoplasia mais superficial que se desenvolve na epiderme e que apresenta displasia epidérmica parcial. A progressão de *QA* para *CCE* ocorre em taxas de 0,025% a 16% ao ano (Dubas; Ingraffea, 2013).

A agressividade do *CCE* pode ser categorizada em relação à área superficial da epiderme que o tumor ocupa e ao grau de diferenciação dos queratinócitos. A doença *in situ* está correlacionada com o envolvimento de toda a epiderme, de modo que lesões mais invasivas mostram alcance dérmico. Em relação ao grau de diferenciação celular, o *CCE* se subdivide em 3 categorias nas quais os tumores mais agressivos e que apresentam maiores taxas de recorrência (28,6%) e metástases (32,8%) são aqueles que apresentam queratinócitos pouco diferenciados. Os *CCE* que apresentam queratinócitos bem diferenciados apresentam taxas de recorrência de 13,6% e ocorrência de metástases de 9,2% (Rowe; Carroll; Day, 1992).

O *CCE* assim como o *CCB* é raramente letal. No entanto, o *CCE* é um câncer que pode facilmente metastizar, além de destruir órgãos sensoriais como nariz, orelhas e lábios (Khan; Alam; Yoo, 2011).

O padrão ouro de tratamento do câncer de pele é a remoção cirúrgica do tumor. No entanto, este tipo de tratamento resulta muitas vezes em desfiguração da face (Figura 6), trazendo sérios danos emocionais ao paciente, com consequente diminuição de sua adesão ao tratamento (Clarke, 2012).

Figura 6: Resultado cosmético da cirurgia de carcinoma de células escamosas de tumor localizado na região da cabeça e pescoço.

Fonte: Lazareth (2013).

Para *CPNMs* que não são facilmente tratados com cirurgia, as opções incluem a curetagem, uso de nitrogênio líquido e administração tópica de formulações semissólidas contendo os fármacos 5-fluorouracil (5-FU), imiquimode e diclofenaco (Simões ; Sousa; Pais, 2015).

O 5-FU é um fármaco com estrutura análoga a tiamina, que atua inibindo a timidilato sintase, uma enzima crítica na síntese do DNA. Desta forma, 5-FU previne a proliferação celular, resultando na morte das células, de modo que seus efeitos mostram-se mais pronunciados em células com divisão celular acelerada (Longley; Harkin; Johnston, 2003).

O uso tópico do 5-FU se iniciou em 1962 após o relato de um caso de cura de *QA* em pacientes que receberam o fármaco sistemicamente (Falkson; Schulz, 1962). Em 1963, uma pomada hidrofílica de 5-FU 5% foi utilizada no tratamento de pacientes com *QA* por 4 semanas (Dillaha et al., 1983). A partir de 1970, desde sua aprovação pelo FDA USA, o 5-FU tem sido tratamento de escolha para a *QA*, estando disponível na forma de creme (5, 1 e 0,5%) e solução (5, 2 ou 1%). No entanto, o uso dessa medicação está associado a alguns efeitos colaterais como intensa reação inflamatória local que, somado ao longo período de tratamento diminui a adesão do paciente. Outra desvantagem é a ineficácia parcial do tratamento nas camadas mais profundas da pele uma vez que o fármaco não consegue atravessar o EC em concentração e profundidade suficiente, principalmente em casos de *QA* hiperqueratótica (Barrera; Herrera, 2007).

O diclofenaco é um antiinflamatório não estereoidal que atua inibindo a enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), resultando na redução da síntese de prostaglandinas (Peters; Foster, 1999) cujo aumento na produção parece estar associado ao desenvolvimento do *CPNM* (Marks; Furstenberger; Muller-Decker, 1999). A COX-2 mostra-se super expressa em vários tipos de câncer, entre eles, *QA*, melanona e *CPNM*. A Prostaglandina E2 tem um importante papel na expressão do gene Bcl-2, produção de IL-6 e inibição das vias apoptóticas. Desta forma, uma redução na produção de COX-2 pode diminuir o crescimento tumoral via inibição da angiogênese, apoptose e invasão tumoral (Masferrer et al., 2000). Diversos estudos tem mostrado a eficácia de formulações contendo diclofenaco no tratamento de *QA* (Tutrone et al., 2003). O uso do diclofenaco é aprovado pelo FDA para o tratamento de *QA*; no entanto, é utilizado apenas nos EUA (Berrera ; Herrera, 2007) na forma de gel contendo 3% de diclofenaco.

Imiquimode é um fármaco modificador da resposta imune que interage direta e indiretamente com o sistema imunológico (Perrota et al., 2011). O uso de imiquimode para o tratamento de verrugas genitais e perianais foi aprovado pelo FDA em 1997, sendo utilizado para o tratamento de outras neoplasias cutâneas sem a aprovação do FDA (Burn; Brown, 2005). Em 2004, o FDA aprovou o uso de um creme contendo 5% de imiquimode para o tratamento de *QA* e *CCB* superficial em pacientes para os quais a cirurgia não era uma opção (Perrota et al., 2011). Ainda assim, sem a aprovação do FDA, o imiquimode tem sido comumente usado para o tratamento de melanoma cutâneo com metastases, *CCB* e *CCE*. No entanto, estudos revelaram que grande parte dos pacientes tratados com imiquimode exibiram algum grau de inflamação local de aplicação. Nos estudos realizados pelo FDA, foi observado a formação de eritema, edema, ulceração ou erosão (Burn; Brown, 2005).

É interessante notar que os medicamentos tópicos atuais aprovado pelo FDA para o tratamento do câncer de pele são usados principalmente para tratar as modalidades iniciais do câncer, que se desenvolvem apenas na superfície da pele. No entanto, alguns cânceres, tais como *CCE*, podem acometer as camadas mais profundas da epiderme e até alcançar a derme, ou então desenvolver metástases em locais onde os fármacos aplicados topicamente não conseguem alcançar em profundidade e quantidades terapêuticas. Burns e Burrows (2005) relataram que o imiquimode foi mais eficaz no tratamento tópico de *CCB* superficial do que no tratamento do *CCB* nodular. Portanto, a resposta terapêutica do tratamento tópico difere para cânceres superficiais e invasivos. Tal fato se deve a profundidade do tumor e a capacidade do fármaco em penetrar profundamente na pele. Enquanto o *CCB* superficial se

encontra apenas nas camadas superficiais da epiderme, o CCB nodular atinge a derme de forma que o fármaco não pode alcançar toda a profundidade do tumor.

As desvantagens mencionadas acima relacionadas ao tratamento tópico atualmente disponível para o câncer de pele enfatizam a necessidade de desenvolver novas formulações ou métodos para aumentar a penetração de fármacos antineoplásicos na pele.

2.2. Penetração de fármacos na pele

A aplicação tópica de fármacos na pele é a via de administração preferida para o tratamento de doenças localizadas neste tecido. Ela permite que o fármaco seja administrado diretamente no local onde deve agir, evitando assim efeitos colaterais sistêmicos que ocorrem com frequência quando outras vias de administração, oral ou intravenosa, são utilizadas para o tratamento de uma doença de pele.

Para um tratamento tópico ser efetivo, no entanto, o fármaco tem que penetrar a camada mais externa da pele, o EC, e atingir, em concentrações terapêuticas, as camadas mais profundas deste tecido, onde a grande maioria das patologias cutâneas se encontra (Gelfuso et al., 2011). O EC é, no entanto, uma barreira efetiva para a penetração de substâncias na pele, dificultando a entrada da maioria dos fármacos, principalmente daqueles hidrofílicos e com alta massa molecular. Isso porque, em condições normais, ele é composto por corneócitos dispersos em uma matriz lipídica organizada em bicamadas lamelares. A dificuldade em se permear o EC provém da organização destas bicamadas lipídicas e dos corneócitos (Bergh et al., 1997). Em condições patológicas, o EC tumoral pode apresentar-se hiperqueratinizado (Neel; Sober, 2006) (Figura 7), o que dificulta ainda mais a penetração dos fármacos antineoplásicos na pele.

Figura 7: Representação esquemática das camadas da pele com ênfase no EC: A) EC normal, em pele saudável e B) EC tumoral hiperqueratinizado.

Fonte: Taveira e Lopez (2011).

Uma substância é capaz de atravessar o EC por três vias distintas: entre os corneócitos, permanecendo na matriz lipídica (via intercelular); através dos corneócitos e da matriz lipídica (via transcelular) ou através dos anexos da pele como os pelos, as glândulas e as imperfeições da pele (via apêndices) (Moser et al., 2001) (Figura 8). Desta forma, para o tratamento tópico efetivo do câncer de pele, o fármaco deve atravessar o EC para atingir as camadas mais profundas da pele onde estes tumores se desenvolvem.

Figura 8: Vias de penetração de fármacos através do EC: A) através da matriz lipídica, entre os corneócitos (penetração intercelular) e através dos corneócitos e da matriz lipídica (penetração transcelular) e B) via apêndices cutâneos.

Fonte: Gratieri; Gelfuso e Lopez (2008).

Portanto, diversas técnicas têm sido relatadas na literatura como propostas para romper a barreira do EC e aumentar assim a permeabilidade da pele e direcionar os fármacos para as células tumorais. Entre essas técnicas destaca-se em nosso grupo de pesquisa o uso de nanocarreadores (De Campos Araújo et al., 2010, Taveira et al., 2012, Taveira et al., 2014) e de promotores de permeação químicos e físicos (Herai et al., 2007, Simonetti et al., 2009, Taveira, et al., 2009, Gelfuso et al., 2011, Lopez et al., 2011, Souza et al., 2011b, Gelfuso et al., 2013).

2.2.1. Nanopartículas lipídicas sólidas como estratégia para aumentar a penetração de fármacos na pele

Como mencionado anteriormente, o protocolo utilizado atualmente no tratamento tópico do câncer de pele baseia-se na aplicação de cremes contendo 5-FU, diclofenaco ou imiquimoda (Simões ; Sousa; Pais, 2015). No entanto, o insucesso clínico desta terapia está

relacionado à baixa penetração dos fármacos na pele e aos efeitos colaterais, muitas vezes na forma de intensa reação inflamatória local (Clarke, 2012). Desta forma, é importante que a formulação utilizada aumente a penetração do fármaco até as camadas mais profundas da pele, atingindo os sítios tumorais (Schmid ; Korting, 1996).

Recentemente, o uso de nanocarreadores na administração tópica tem melhorado a habilidade de fármacos em penetrar a pele, aumentado a estabilidade dos mesmos, além de reduzido os efeitos colaterais associados ao contato direto do fármaco com a superfície da pele (De Campos Araújo et al., 2010, Taveira et al., 2012, Taveira et al., 2014). Entre os nanocarreadores mais estudados na atualidade para a administração tópica destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS).

As NLS foram desenvolvidas tecnologicamente por Gasco (Gasco, 1993) como uma alternativa aos sistemas de liberação mais tradicionais como as nanopartículas poliméricas, lipossomas e emulsões (Figura 9). As NLS são compostas por lipídeos sólidos a temperatura ambiente e corporal e por tensoativos, os quais estabilizam a dispersão aquosa de NLS. Devido à baixa mobilidade dos lipídeos sólidos, as NLS possuem maior estabilidade e habilidade de controlar a liberação de fármacos quando comparadas aos lipossomas e nanoemulsões, respectivamente. Em adição, as NLS não são tóxicas, uma vez que são compostas por lipídeos biocompatíveis e biodegradáveis. São também facilmente produzidas em escala industrial sem a necessidade do uso de solventes orgânicos (Mehnert, Mader, 2012).

Figura 9: Representação esquemática dos diferentes sistemas nanocarreadores de fármacos. A) lipossoma, B) nanoemulsão e C) nanopartícula lipídica sólida.

Fonte: Okoro; John e Ogbonna (2014).

São poucos os problemas encontrados no desenvolvimento das NLS, mas o maior deles é a sua instabilidade por longos períodos de tempo. Muitos autores relatam a expulsão

do fármaco durante o período de estocagem destas formulações, principalmente devido à composição das partículas e de seus processos de produção (Souto; Muller, 2008). Isto acontece porque, durante a produção das NLS, a etapa de solidificação e cristalização dos lipídeos pode levar à imperfeições na matriz, permitindo a acomodação das moléculas de fármaco entre as bicamadas lipídicas e as cadeias de ácidos graxos (Wissing; Muller, 2003, Muller et al., 2007). Esta cristalização ocorre principalmente com polímeros de maior energia (α' , β'), e, conseqüentemente, mais instáveis. Sendo assim, durante a estocagem, estes lipídeos podem se reorganizar em formas de menor energia, mais estáveis e altamente organizadas (formas β), expulsando o fármaco que estava localizado nas imperfeições dos cristais (Muller; Radtke; Wissing, 2002). Se a forma polimórfica β surgir no processo de armazenamento, e o fármaco for expulso da matriz lipídica, este não poderá ser protegido contra degradação, nem terá sua liberação controlada quando administrado.

Para contornar os problemas relacionados à estabilidade a longo prazo das NLSs o preparo das nanopartículas com lipídeos que não formam cristais altamente organizados vem sendo explorada (Attama et al., 2007). Para tanto, lipídeos formados por ácidos graxos de tamanho de cadeias variadas, líquidos e sólidos, são misturados, formando pequenos reservatórios líquidos dentro da partícula, evitando a formação de cristais altamente organizados (Figura 10) (Muller; Radtke; Wissing, 2002, Wissing; Kayser; Muller, 2004). As nanopartículas produzidas por esta mistura de lipídeos sólidos e líquidos são denominadas de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN) (Attama et al., 2007).

Figura 10: Representação esquemática: A) NLS contendo lipídeos sólidos e B) CLN contendo uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos com cadeias carbônicas de tamanhos variados (cristais pouco organizados).

Fonte: Andrade et al. (2011).

Os CLN são, portanto, a segunda geração de carreadores lipídicos sólidos desenvolvidos para superar os problemas de instabilidade associados às NLS. A combinação de lipídeos sólidos e líquidos na sua composição diminui a expulsão do fármaco a partir da matriz lipídica permitindo um maior controle das condições de armazenamento e da liberação do fármaco encapsulado (Uner, 2006).

A administração tópica de nanopartículas lipídicas como carreadores de agentes antineoplásicos representa uma estratégia não invasiva para o tratamento do câncer de pele. Elas podem ser formuladas para sustentar a liberação do antineopláscio encapsulado, ocluir e hidratar a pele e aumentar a penetração tumoral do fármaco com reduzidos efeitos adversos (Muller; Radtke; Wissing, 2002, Pardeike; Hommos; Muller, 2009, Igbal et al., 2012, Mehnert; Mader, 2012). A maior vantagem associada ao uso dos carreadores lipídicos na encapsulação de agentes antineoplásicos é sua habilidade de encapsular fármacos com diferentes características físico-químicas, aumentando a estabilidade desses fármacos e diminuindo os efeitos tóxicos, aumentando a eficácia do tratamento (Joshi; Muller, 2009; Yassin et al., 2010).

Vários trabalhos que utilizaram esses nanocarreadores na veiculação de agentes antineoplásicos já foram relatados. Liu et al. (2011) desenvolveram um CLN contendo docetaxel com o objetivo de aumentar sua eficácia terapêutica. Os autores demonstraram uma eficiente incorporação do fármaco no carreador e uma liberação sustentada e contínua do mesmo. A citotoxicidade do docetaxel contra células de adenocarcinoma de pulmão (linhagem A 459) foi maior do que a apresentada pelo fármaco não encapsulado e o crescimento tumoral de melanoma cutâneo (B16) foi inibido *in vivo* mais efetivamente pelo CLN-docetaxel do que pelo fármaco livre. Souza et al. (2011a) relataram uma liberação sustentada e aumento da estabilidade e citotoxicidade do topotecan encapsulado em NLS e CLN. Athawale et al. (2014) demonstraram o aumento da citotoxicidade do etoposídeo quando encapsulado em NLS frente as células de melanoma maligno (B16F10). Também foi demonstrado por esses autores que a encapsulação do etoposídeo favoreceu seu acúmulo em determinados órgãos altamente perfundidos, sugerindo a eficiência das NLS desenvolvidas para o tratamento do melanoma cutâneo metastizado, uma vez que células cancerígenas metastizam através do sistema sanguíneo e linfático. SLNs foram utilizados como carreador do resveratrol, um promissor fármaco quimiopreventivo: o efeito citostático do fármaco encapsulado foi muito mais evidente do que o do resveratrol na sua forma livre, em solução (Teskac; Kristl, 2010). NLS e CLN contendo complexos de rutênio foram desenvolvidos e caracterizados para explorar a sua influência na administração tópica desses complexos para

tratamento do câncer de pele (Marquele-Oliveira et al., 2010). Além disso, recentemente, NLS modificadas com peptídeos célula-penetrantes (CPPs) foram preparados para a liberação de siRNA dentro das células, demonstrando o efeito da encapsulação na melhora da estabilidade do siRNA no soro e no maior silenciamento de genes (Asai et al., 2014). NLS de metotrexato revestidas por hialuronano, com o objetivo de aumentar a afinidade do carreador-fármaco pelas células de melanoma (B16F10) também já foram estudadas (Mizrahy et al., 2014). Além destes, estudos tem mostrado vantagens na encapsulação de idarrubicina (Cavalli et al., 1993), 5-FU (Yassin et al., 2010), camptotecina (Yang et al., 1999), daunorrubicina (Contente et al., 2014) e etoposídeo (Athawale et al., 2014) em relação a forma livre desses fármacos.

Atualmente, nosso grupo de pesquisa tem investigado o efeito da encapsulação da doxorubicina (DOX) em NLS visando à administração tópica (Taveira et al., 2012, Taveira et al., 2014, Huber et al., 2015).

A DOX é um antibiótico e antineoplásico da classe das antraciclinas, amplamente utilizada no tratamento de tumores sólidos (Vokes; Golomb, 2003), sendo utilizada na quimioterapia sistêmica do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Ermercan; Hellings; Cinge, 2012). No entanto, ela não é o fármaco de primeira escolha no tratamento quimioterápico sistêmico do câncer de pele, especialmente por causa de sua alta toxicidade em razão da administração intravenosa, que causa efeitos colaterais graves como a mielossupressão, mucosite e severa toxicidade cardíaca (Voke; Golomb, 2003, Wartofsky; Nostrand, 2006).

A administração tópica da DOX, diretamente no local do tumor, poderia reduzir os efeitos tóxicos decorrentes de sua administração sistêmica. No entanto, devido à característica hidrofílica da molécula, a DOX apresenta uma baixa penetração cutânea quando aplicada passivamente na sua forma livre (Herai et al., 2007, Taveira et al., 2009). É na tentativa de aumentar a penetração cutânea da DOX que nosso grupo vem estudando novas estratégias para sua administração tópica. Desta forma, nós já verificamos que sua encapsulação em NLS aumenta sua penetração cutânea (Taveira et al., 2014), além de sua citotoxicidade frente a células de melanoma cutâneo (B16F10) (Taveira et al., 2012) e carcinoma de células escamosas (Taveira et al., 2014). . Recentemente, Huber et al. (2015) mostrou que a encapsulação da DOX em NLS catiônica composta por ácido esteárico e monoleína aumentou a penetração passiva do fármaco 2,7 vezes no EC e 3,4 vezes na epiderme viável. A aplicação da iontoforese, um promotor de permeação cutânea físico, na dispersão de NLS catiônica aumentou a penetração da DOX encapsulada aproximadamente 60 vezes no EC e 42 vezes na epiderme viável em relação ao fármaco livre. A associação da iontoforese com NLS aniônicas

também aumentou a penetração DOX (Taveira et al., 2014), mas em quantidades relativas menores do que às aquelas observadas para a associação com as NLS catiônicas.

Desta forma, assumem-se os efeitos positivos da encapsulação da DOX em NLS e seu potencial uso como uma estratégia no tratamento do câncer de pele, uma vez que a encapsulação aumentou o efeito citotóxico bem como a penetração do fármaco. Em adição, a associação de métodos físicos se mostra com uma estratégia promissora para tratamentos de tumores, que requerem altas concentrações do antineoplásico para serem efetivos, uma vez que aumentam ainda mais a penetração do fármaco na pele.

2.2.2. Ultrassom de baixa frequência como estratégia para aumentar a penetração de fármacos na pele

Ultrassom é uma onda longitudinal, com frequência acima da audível pelo ouvido humano (> 20.000 Hz), que se propaga de forma circuncêntrica apenas em meios materiais, ou seja, em meios que possuem massa e elasticidade (Figura 11) (Polat et al., 2011a).

Figura 11: Classificação do som segundo o ponto auditivo do homem.

Fonte: Engenharia audiovisual (2015).

Quando as ondas sonoras se propagam, elas causam um movimento oscilatório das partículas do meio no qual elas estão viajando. A propagação do som no meio leva então ao deslocamento dessas partículas, resultando na formação de áreas de rarefação (baixa pressão) e compressão (alta pressão) que são caracterizadas por um menor e maior agrupamento das partículas respectivamente (Figura 12) (Leighton, 1998). Muitos fenômenos interessantes podem ocorrer em solução aquosa devido à oscilação das ondas sonoras, dos quais alguns resultam na maior penetração de fármacos através da pele pela técnica conhecida como sonoforese (Polat et al., 2011a).

Figura 12: Representação esquemática da formação de áreas de rarefação e compressão durante a propagação do som em um determinado meio.

Fonte: Conceitos básicos sobre acústica (2015).

As ondas ultrassônicas são criadas através da geração de um sinal elétrico que é subsequentemente amplificado antes de ser enviado para a sonda do transdutor ultrassônico. Uma vez que o sinal elétrico chega na sonda, ele é convertido em onda mecânica por cristais piezoelétricos através da ponta do transdutor e transmitida ao meio desejado (Polat et al., 2011a).

Na aplicação do ultrassom na pele visando o aumento da penetração de fármacos, ou seja, na sonoforese, duas características das ondas ultrassônicas são de extrema importância: a amplitude da onda, que se refere à medida escalar de oscilação de uma onda e a frequência (Hz), que indica o número de ocorrências de um evento em um determinado intervalo de tempo (segundos) (Figura 13).

Figura 13: Representação esquemática da amplitude e frequência da onda sonora.

Fonte: Conceitos básicos sobre acústica (2015).

O ultrassom é geralmente dividido dentro de três faixas de frequência: i) baixa frequência, ou ultrassom de baixa frequência (LFU), na faixa de 20 a 100 kHz , (ii) terapêutico, com frequências na faixa de 0,7 a 3 MHz e (iii) alta frequência (HFU), acima de 3 MHz (Polat; Blankschtein; Langer, 2010). Esta distinção é realizada em função das diferentes alterações causadas na pele associadas ao LFU e HFU (Polat et al., 2011a), as quais serão discutidas posteriormente.

Os primeiros relatos dos efeitos biológicos do ultrassom datam de 1917, após Paul Langevin observar a morte de peixes que se encontravam próximos ao campo acústico quando um transdutor ultrassônico a 150 kHz e 1 Kw foi imerso em um lago (Duck, 2008). Em 1927 foi reconhecido que o ultrassom poderia produzir mudanças no ambiente biológico, o que resultou em seu uso como técnica de imagem. A partir da década seguinte, o ultrassom começou a ser utilizado no tratamento de condições médicas.

A sonoforese foi primeiramente relatada em 1950, quando Fellingner e Schmidt (Fellinger; Schmid, 1954), usando uma pomada de hidrocortisona em combinação com ultrassom, obtiveram sucesso no tratamento de poliartrite nas articulações dos dedos das mãos. Nos primeiros estudos, as aplicações mais frequentes envolviam o uso do HFU (> 0,7 MHz) para a liberação local de corticosteróides (Newman; Kill; Frampton, 1958), chegando a empregar frequências tão altas quanto 16 MHz (Tyle; Agrawala, 1989, Bommannan et al., 1992a). Com o emprego do HFU nesses primeiros estudos, uma melhora de 1 a 10 vezes foi alcançada na penetração de fármacos (Byl, 1995, Mitragotri; Blankchstein; langer, 1995, Mitragotri; Blanlchstein; Langer, 1996).

Os primeiros estudos utilizando LFU foram conduzidos por Tachibana e Tachibana que relataram que a aplicação do LFU aumentou o transporte transdérmico de insulina e lidocaína em coelhos e camundongos *in vivo* (Tachibana; Tachibana, 1991, Tachibana, 1992, Tachibana; Tachibana, 1993). Tachibana e Tachibana (1991) observaram que o nível de glicose em camundongos *hairless* imersos em um tanque com solução de insulina (20 UI/mL) diminuiu em 50% quando o LFU (48 kHz, 5000 Pa) foi aplicado por 240 minutos. Tachibana e Tachibana (1993) observaram que a utilização do LFU em condições similares foi capaz de prolongar o efeito anestésico da lidocaína na pele de camundongos *hairless* e Tachibana (1992) observou a melhora no transporte transdérmico de insulina em coelhos diabéticos. Mas foi apenas após a publicação do trabalho de Mitragotri et al. (1995) que os pesquisadores se convenceram do melhor efeito do LFU em detrimento do HFU na liberação transdérmica de fármacos. Esses autores mostraram que a eficiência da sonoforese em aumentar a permeabilidade da pele estava relacionada à cavitação. Mais tarde, concluíram que, devido a

bem conhecida relação entre cavitação e frequência, o LFU era capaz de desorganizar mais a pele do que o HFU, aumentando o transporte transdérmico do ácido salicílico através da pele de camundongos *hairless*, *in vivo*, 300 vezes em relação ao HFU (Mitragotri; Langer; Blankschtein, 1996). Em adição, Mitragotri; Langer e Blankschtein (1996) demonstraram o sucesso do LFU em liberar macromoléculas como IFN- γ e eritropoetina através da pele humana *in vitro*.

Baseado neste contexto, nas últimas décadas, pesquisadores têm focado seus estudos nos mecanismos envolvidos na melhora da permeabilidade da pele associada ao uso do LFU para a liberação transdérmica de fármacos com baixa penetração cutânea, principalmente macromoléculas.

2.2.2.1. Mecanismos do LFU

A partir do momento em que foi estabelecida a maior eficiência do LFU em aumentar a permeabilidade cutânea (Mitragotri; Langer; Blankschtein, 1996), os novos estudos realizados concentraram-se nos mecanismos pelos quais o LFU aumenta a permeabilidade da pele, ou seja, no entendimento do modo pelo qual o LFU desorganiza a pele.

Baseado em protocolos experimentais, a sonoforese pode ser realizada utilizando dois tipos de tratamento da pele: o tratamento simultâneo e o pré-tratamento.

- *Tratamento simultâneo*

Corresponde à aplicação simultânea do ultrassom mais fármaco, ambos através de um meio de acoplamento, na pele (Tachibana; Tachibana, 1991, Tachibana, 1992, Mitragotri; Langer; Blankschtein, 1996, Smith et al., 2003). O aumento na permeabilidade cutânea associada ao uso do tratamento simultâneo da pele pode estar relacionada à (i) melhora da difusão do fármaco através das alterações estruturais da pele e (ii) convecção induzida pelo ultrassom. Este tipo de protocolo é mais comumente utilizado com o HFU (Barja; Veloso, 2010, Kaya et al., 2010, Maia Filho et al., 2010, Silveira; Barja; Acosta-Avalos, 2010, Meshali et al., 2011). No entanto, a aplicação deste protocolo é limitada devido à (i) ação do ultrassom no fármaco ou substância ativa, que pode causar degradação da molécula, levando a perda da atividade e efetividade terapêutica do composto, além de efeitos indesejados causados pela ação de espécies desconhecidas geradas como resultado da degradação (Riesz; Kondo, 1992); (ii) implicações clínicas, uma vez que o tratamento simultâneo requer que o paciente use o dispositivo durante todo o tratamento (Ogura; Paliwal; Mitragotri, 2008); e por

fim, (iii) o uso do LFU para liberação transdérmica tem se mostrado mais efetivo em aumentar a permeabilidade da pele que o HFU (Mitragotri; Langer; Blankschtein, 1996), sem a necessidade do fluxo convectivo associado ao tratamento simultâneo.

- *Pré-tratamento da pele*

Neste protocolo, uma curta aplicação do ultrassom é realizada para permeabilizar a pele antes da aplicação do fármaco (Mitragotri; Kost, 2001, Tezel et al., 2001, Tezel et al., 2004, Tezel et al., 2005). Desta forma, o aumento da permeabilidade da pele está relacionado apenas às alterações estruturais da mesma causadas pela aplicação do ultrassom. Embora o pré-tratamento possa ser utilizado em ambos, LFU e HFU, este protocolo é mais frequentemente utilizado com o LFU, incluindo estudos clínicos (Katz et al., 2004, Becker et al., 2005, Brown et al., 2006, Spierings; Brevard; Katz, 2008).

Desta forma, os mecanismos envolvidos na melhora da permeabilidade cutânea quando o ultrassom é aplicado na pele podem ser divididos em (i) mecanismos não-cavitacionais e (ii) cavitação.

2.2.2.2. Mecanismos não-cavitacionais

- *Convecção*

Mais uma vez é importante ressaltar que os mecanismos associados à melhora na permeabilidade da pele quando a sonoforese é utilizada estão relacionados ao tipo de protocolo utilizado (Polat et al., 2011a). Desta forma, é completamente viável que a convecção ocorra quando o tratamento simultâneo é utilizado, ao passo que, quando se utiliza o pré-tratamento, é menos provável que a convecção influencie na penetração do fármaco devido a ausência deste no meio de acoplamento. Assim, a convecção como mecanismo de aumento na permeabilidade da pele está mais frequentemente associada ao uso do HFU, que é aplicado na solução de acoplamento que contém o fármaco, embora Tachibana et al. (1993) tenham observado a indução de fluxo convectivo na aplicação simultânea do LFU a 48 kHz e 0,17 W/cm² induziu, aumentando o efeito anestésico da lidocaína 2% (Tachibana; Tachibana, 1993). No entanto, enquanto a convecção tem sido citada como possível mecanismo de melhora na permeabilidade cutânea quando HFU é utilizado (Lenart; Ausländer, 1980, Brucks et al., 1989, Levy et al., 1989, Simonin, 1995), este não corresponde ao principal mecanismo, além de não estar presente entre os mecanismos de melhora citados em uma série de outros estudos (Bommannan et al., 1992a,b, Machluf; Kost, 1993, Byl, 1995, Mitragotri et al., 1995).

- *Efeitos térmicos*

A propagação da onda sonora leva ao aumento da temperatura do meio no qual ela se propaga. Esse aumento de temperatura pode aumentar a permeabilidade da pele por aumentar a energia cinética e difusibilidade do fármaco, dilatar os pontos de entrada na pele (folículos pilosos e glândulas) e melhorar a circulação do sangue nas áreas tratadas pelo ultrassom, com consequente aumento na absorção de fármacos (Byl, 1995, Simonin, 1995). No entanto, estudos mostram que, para que a temperatura tenha um efeito no aumento do transporte de fármacos, esse aumento deve ser superior a 10°C (Lenart; Ausländer, 1980).

Meidam et al. (1995) concluíram que o aquecimento é o principal mecanismo de ação associado ao uso do HFU. Ueda; Sugibayashi e Morimoto (1995) também mostraram que os efeitos térmicos aumentam significativamente a permeabilidade cutânea de fármacos hidrofílicos quando frequências intermediárias do ultrassom (150 kHz e 2 W/cm²) são utilizadas.

No entanto, em estudos recentes, principalmente utilizando LFU e altas amplitudes têm focado sua atenção em controlar e minimizar efeitos térmicos. A exposição da pele a altas temperaturas e por um tempo prolongado pode causar efeitos deletérios na sua superfície como queimaduras, destacamento e necrose da epiderme viável ou tecidos subjacentes (Boucaud et al., 2001). Uma vez que os efeitos térmicos são diretamente proporcionais a intensidade e ao ciclo de trabalho do ultrassom, os protocolos atuais usando LFU, em sua grande maioria, trabalham com ciclos de 5s ON, 5s OFF e requerem, nos estudos *in vitro*, uma troca periódica do meio de acoplamento, geralmente após 1 minuto de tratamento no ciclo de trabalho indicado anteriormente, com o objetivo de minimizar os efeitos térmicos para que esse efeito não tenha um papel significativo no aumento da permeabilidade da pele (Tang et al., 2002, Tezel; Sens; Mitragotri, 2002, Alvarez-Román et al., 2003).

2.2.2.3. Cavitação

Significante atenção tem sido dada a cavitação associada ao uso do ultrassom e sua relação com o aumento da permeabilidade cutânea (Bommannan et al., 1992a,b, Mitragotri et al., 1995, Alvarez-Román et al., 2003, Simonin et al., 1995, Tezel; Sens; Mitragotri, 2003). Um entendimento comum é o de que a cavitação acústica é o principal mecanismo responsável pelo aumento da permeabilidade da pele, principalmente quando se utiliza LFU (Mitragotri et al., 1995, Tang; Blankschtein; Langer, 2002, Tezel; Sens; Mitragotri, 2002, Tezel; Sens; Mitragotri, 2003).

Cavitação acústica pode ser definida como o processo pelo qual cavidades ou bolhas de ar são formadas em um meio em resposta a aplicação do ultrassom. Essas bolhas podem oscilar, crescer, se dividir ou interagir com outras bolhas (Polat et al., 2011a). Durante a aplicação do LFU, a cavitação acústica é predominantemente induzida no meio de acoplamento (líquido presente entre a sonda do transdutor e a pele), de modo que o raio das bolhas de cavitação está diretamente relacionado à frequência aplicada do ultrassom (Equação I, Figura 14,).

Equação I

$$C = r_{res} \cdot f$$

Onde: r_{res} corresponde ao raio ressonante da bolha de cavitação, f corresponde à frequência do ultrassom e C corresponde à constante que esta relacionada às propriedades do meio no qual o ultrassom é aplicado.

Figura 14: Representação esquemática da onda sonora de alta e baixa frequência.

Fonte: Conceitos básicos sobre acústica (2015).

Devido à bem estabelecida relação inversa entre a frequência e o tamanho das bolhas de cavitação, acredita-se que o local onde a cavitação ocorra seja diferente quando se utiliza HFU e LFU, resultando em extensões diferentes no aumento da permeabilidade cutânea. Nas condições utilizadas no HFU (frequências acima de 0,6 MHz), estima-se que o raio das bolhas seja menor do que 1 μm (Polat et al., 2011a) e que as mesmas entrem no EC e apêndices cutâneos (Figura 15). A cavitação dentro da pele, considerada como principal mecanismo responsável pelo aumento da permeabilidade cutânea usando HFU, foi comprovada em um importante estudo conduzido por Mitragotri; Blankschtein e Langer (1996). Neste estudo, os

autores mostraram por microscopia que a aplicação na pele de HFU (1 a 3 MHz) causava bolhas de ar dentro de cavidades próximas aos corneócitos do EC. A partir de então levantaram a hipótese de que a oscilação das bolhas de cavitação dentro do EC induz a desorganização das camadas lipídicas, resultando em aumento da permeabilidade (Mitragotri; Blakschtein; Langer, 1996). A cavitação dentro da pele também foi observada por Bommannan et al. (1992a) em um estudo usando frequências de até 16 MHz.

Figura 15: Representação das bolhas de cavitação dentro do EC, resultando na diminuição da função barreira da pele.

Fonte: Polat et al. (2011a).

Por outro lado, quando o LFU (frequência entre 20 e 100 kHz) é aplicado, o raio estimado para as bolhas de cavitação está compreendido entre 10 e 150 μm , muito grandes para entrarem no EC. Estima-se, portanto, que a cavitação neste caso ocorra apenas no meio de acoplamento, acima da superfície da pele (Figura 16) e que a energia liberada durante seu colapso seja a responsável por alterar a permeabilidade do EC (Bommannan et al., 1992b, Mitragotri et al., 1995, Simonin, 1995).

Figura 16: Representação esquemática da cavitação no meio de acoplamento com colapso assimétrico de uma bolha de cavitação levando a formação de microjatos líquidos de alta velocidade que rompem o EC.

Fonte: Polat et al. (2011a).

Os primeiros estudos que evidenciaram a cavitação como mecanismo primário no aumento da permeabilidade da pele na presença do LFU foram conduzidos por Tang et al. (2002) em uma série de experimentos a 20 kHz, que envolviam a supressão seletiva da cavitação hora dentro, hora fora da pele. Nesses estudos, para mostrar que a cavitação fora da pele tem um efeito mais significativo na desorganização do EC do que a cavitação dentro da pele, os autores suprimiram a cavitação fora da pele utilizando um meio de acoplamento de alta viscosidade, o óleo de mamona. Não foi observada nenhuma mudança na permeabilidade da pele. Posteriormente, os autores utilizaram uma célula de alta pressão que permitia a supressão da cavitação dentro e fora da pele. Mais uma vez não foi observada nenhuma melhora na permeabilidade da pele. Concluiu-se que a cavitação no meio de acoplamento é o principal mecanismo pelo qual LFU permeabiliza a pele (Tang et al., 2002).

A cavitação acústica pode ocorrer de duas maneiras, sendo elas:

- Cavitação estável, que corresponde a oscilação contínua de bolhas de cavitação ao redor de um raio de equilíbrio em resposta a uma pressão acústica relativamente baixa em um campo acústico, sem que ocorra o colapso dessas bolhas (Carvell; Bigelow, 2011). A oscilação das bolhas causa o deslocamento de pequenas quantidades do meio ao redor delas, levando a formação de correntes que se movimentam com alta velocidade. Essas correntes são chamadas microcorrentes (Mitragotri; Blankschtein; Langer, 1996). As características das microcorrentes são determinadas tanto pelas propriedades dos fluídos, como densidade e viscosidade, quanto pelas características do ultrassom, como intensidade, frequência e amplitude (Nightingale; Kornguth; Trahey, 1999), de forma que a velocidade da microcorrente diminui em função da viscosidade do meio (Barnett et al., 1994). Estudos mostram que microcorrentes próximas à superfície das membranas podem afetar a membrana celular (Willians, 1973, Wu; Nyborg, 2008) por gerar altas tensões de cisalhamento, as quais resultam no alongamento da membrana, ativando canais e permitindo a liberação de compostos como DNA (Escobar-Chavez et al., 2009).

- Cavitação inercial (ou transiente), que corresponde ao crescimento rápido e descontrolado das bolhas de cavitação sobre vários ciclos de pressão; eventualmente levando ao seu colapso que resulta em ondas de choque ou, se próximo à superfícies rígidas como a pele, à formação de microjatos (Azaguri et al., 2014).

Para elucidar se o aumento da permeabilidade cutânea era resultante da cavitação estável ou transiente, Tang et al. (2002) e Tezel; Sens e Mitragotri (2002) mediram a amplitude da pressão relacionada as emissões sub-harmônicas e ao ruído de banda larga. Emissões sub-harmônicas são causadas pela repetida oscilação das bolhas de cavitação em um

campo acústico e são associadas com a cavitação estável. Ruídos de banda larga são associados ao crescimento rápido e colapso das bolhas e, portanto, relacionados à cavitação transiente. Tanto no trabalho de Tang et al. (2002) como no de Tezel; Sens e Mitragotri (2002) foi mostrado que não houve relação entre as emissões sub-harmônicas e a permeabilidade da pele. Por outro lado, foi observada uma forte correlação entre os ruídos de banda larga e a permeabilidade da pele, sugerindo que a cavitação transiente é o mecanismo mais importante na melhora da permeabilidade da pele sob tratamento com LFU (Tang et al., 2002, Tezel; Sens; Mitragotri, 2002).

Dois eventos ocorrem durante a cavitação transiente: (i) a emissão de ondas de choque, com amplitudes que excedem 10 kbar, geradas durante o processo de colapso das bolhas nos núcleos de alta pressão (Figura 17) (Tezel; Sens; Mitragotri, 2003) e (ii) os microjatos, que são formados quando o contato com uma superfície sólida faz com que a bolha regrida e dê origem a um microjato líquido de alta velocidade em direção à superfície sólida (Figura 17). Esses microjatos podem alcançar velocidades superiores a 100 m/s (Wolloch; Kost, 2010).

Figura 17: Representação esquemática da formação de: a) ondas de choque resultantes do processo de colapso de uma bolha de cavitação no meio de acoplamento, b) microjato líquido

resultante da regressão de uma bolha próxima a superfície da pele e c) processo de regressão de uma bolha resultando na formação de microjato líquido de alta velocidade.

Fonte: Han e Das (2015), Azaguri et al. (2014).

Desta forma, tem sido proposto que a desorganização do EC quando se utiliza LFU pode ocorrer via: (a) ondas de choque geradas próximas à superfície do EC, que podem causar alterações estruturais na interface queratinócitos – lipídeos criando canais de difusão, (b) impacto de microjatos na superfície da pele e (c) penetração dos microjatos de alta velocidade dentro do EC, que aumentam a permeabilidade da pele por romper fisicamente as camadas lipídicas do EC (Donghee et al., 2013, Azaguri et al., 2014) (Figura 18). Quando combinados, esses fatores levam a uma desorganização das camadas lipídicas e a formação de canais aquosos na pele, através dos quais os fármacos podem penetrar (Polat et al., 2011a). No entanto, Wolloch e Kost (2010) mostraram que a contribuição dos microjatos é muito mais significativa do que a contribuição das ondas de choque no aumento da permeabilidade da pele.

Figura 18: Três possíveis mecanismos em função dos quais a cavitação inercial pode melhorar a permeabilidade da pele: a) ondas de choque emitidas durante o processo de colapso das bolhas de cavitação no meio de acoplamento, b) impacto de um microjato líquido na superfície do EC e c) microjatos líquidos penetrando fisicamente dentro do EC.

Fonte: Tezel, Sens e Mitragotri (2003).

2.2.2.4. Vias de permeação na pele: regiões localizadas de transporte (localized transport regions – LTRs)

Os estudos mais recentes com a sonoforese têm demonstrado que a cavitação acústica transiente, que ocorre no meio de acoplamento durante a aplicação do LFU, aumenta a permeabilidade da pele de forma heterogênea, levando a formação de regiões localizadas de alta permeabilidade, denominadas regiões de transporte localizado (LTR, do inglês) (Tezel et

al., 2001, Tezel et al., 2002, Alvarez-Román et al., 2003, Tezel et al., 2004, Paliwal; Menon; Mitragotri, 2006, Kushner et al., 2007, Kushner; Blankschtein; Langer, 2008a, Kushner; Blankschtein; Langer, 2008b) (Figura 19).

Figura 19: Imagem representativa de LTRs na superfície da pele de porco tratada com LFU na frequência de 20 kHz usando meio de acoplamento contendo lauril sulfato de sódio 1%. LTRs foram coradas com *allura red*. A seta indica uma LTR.

Fonte: Polat et al. (2011a).

Desta forma, as *LTRs* são regiões onde ocorre uma alta perturbação do EC induzida pela aplicação do LFU. Tezel et al. (2001) e Tang et al. (2002) observaram a formação de regiões coradas na superfície da pele após o pré-tratamento utilizando LFU na frequência de 20 kHz e na presença de um corante hidrofílico, a sulforrodamina B, no meio de acoplamento, o qual foi capaz de corar as *LTRs*. Usando a calceína como modelo, Kushner; Blankschtein e Langer (2004) demonstraram que as *LTRs* são aproximadamente 80 vezes mais permeáveis do que as regiões que circundam as *LTRs*, conhecidas como *não-LTRs*. Em adição, esses autores mostraram que a resistividade elétrica da pele nas *LTRs* é cerca de 30 e 5000 vezes menor do que a resistividade elétrica encontrada nas *não-LTRs* e na pele não tratada com LFU, respectivamente. Outro dado importante encontrado pelos autores foi que a permeabilidade da pele foi aumentada mesmo nas *não-LTRs*, que exibiram resistividade elétrica cerca de 170 vezes menor do que a pele não tratada. Nestes experimentos, o tensoativo lauril sulfato de sódio (SLS) a 1% (p/v) foi utilizado no meio de acoplamento durante a aplicação do LFU.

A influência da presença do tensoativo SLS no meio de acoplamento no aumento da permeabilidade da pele usando LFU tem sido investigada (Tezel et al., 2002, Polat et al., 2011a). Experimentos realizados utilizando somente LFU (20 kHz e 15 W/cm²) mostraram a formação de uma única *LTR*, diretamente abaixo da sonda do ultrassom (Alvarez-Roman et

al., 2003), enquanto que a adição de SLS 1% (p/v) no meio de acoplamento levou a formação de *LTRs* distribuídas de forma aleatória, recobrando de 5 a 25% da área da superfície da pele tratada com o LFU (Tezel et al., 2001, Tezel et al., 2002, Tezel; Sens; Mitragotri, 2002, Kushner; Blankschtein; Langer, 2004).

Em suma, os trabalhos relatados mostram que dois níveis de aumento na permeabilidade da pele são alcançados após o tratamento com LFU e tensoativo; um maior, correspondente as *LTRs* e um menor, correspondente as *não-LTRs*. Polat et al.(2011b) mostraram que o tamanho da área de cada *LTRs* depende da frequência do LFU aplicada, enquanto que nas *não-LTRs* essa relação não foi observada. Concluíram desta forma que a formação das *LTRs*, bem como o maior aumento da permeabilidade observado nessas regiões, é resultante do impacto dos microjatos na superfície da pele (Polat et al., 2011b, Polat et al., 2012). Por outro lado, devido a independência da frequência na diminuição da resistividade das *não-LTRs*, o aumento da permeabilidade da pele nessas áreas está relacionado à presença do tensoativo, SLS, que penetra as *não-LTRs* via convecção acústica (Polat et al., 2011b, Polat et al., 2012).

É importante ressaltar que não existem relatos da formação de *LTRs* com HFU devido a maior significância das *LTRs* somente a menores frequências (Tezel et al., 2001, Kushner; Blankschtein; Langer, 2008b). Quando o LFU é aplicado, no entanto, as *LTRs* são observadas na ausência ou presença de promotores químicos (Polat et al., 2011a) e mesmo na presença de micropartículas (Alvarez-Roman et al., 2003), porém de forma heterogênea. Sendo assim, um maior entendimento de como a pele, os parâmetros do ultrassom e as características do meio de acoplamento podem influenciar na formação e distribuição das *LTRs* é essencial para tornar a distribuição das *LTRs* mais homogênea na superfície da pele; uma vez que, uma das maiores oportunidades que resultam da descoberta da formação das *LTRs* é a melhora da eficácia e utilidade prática do LFU.

2.2.2.5. Sinergismo do LFU com promotores de permeação químicos e físicos

Um fenômeno significativo observado na sonoforese é que sua combinação com promotores de permeação químicos, como tensoativos, resulta em sinergismo na melhora do transporte transdérmico. Promotores de permeação químicos são substâncias utilizadas para aumentar a permeabilidade da pele via solubilização ou extração dos lipídeos do EC (Johnson et al., 1996). No entanto, assim como muitas moléculas, a eficiência do tensoativo em induzir

considerável desestruturação na pele é limitada pela sua habilidade em difundir para dentro dela (Polat et al., 2011b).

A combinação de ultrassom com promotores químicos foi inicialmente descrita por Johnson et al. (1996). Esses autores mostraram que diferentes combinações de promotores químicos na presença de HFU aumentavam 14 vezes a permeabilidade da pele e 13.000 vezes o fluxo da corticosterona. Esses valores foram 1,6 vezes, para a permeabilidade da pele, e 14,4 vezes, para o fluxo do fármaco, maiores do que os observados na presença dos promotores químicos, mas na ausência do HFU. O aumento da permeabilidade da pele foi atribuído ao aumento da fluidez dos domínios lipídicos no EC ou a formação de uma reserva de fase oleosa na superfície da pele, que levaram ao aumento da eficácia do tratamento (Johnson et al., 1996). O mesmo efeito sinérgico foi observado quando promotores químicos (laurocapram ou SLS) foram associados ao LFU (20 kHz) em estudos de permeação da ciclosporina A (Liu et al., 2006). Os autores observaram um aumento na permeabilidade da pele de rato de uma ordem de magnitude em relação ao controle (Liu et al., 2006).

Mitragotri et al. (2000b) mostraram que o tratamento da pele com LFU e SLS no meio de acoplamento aumentou 200 vezes a permeabilidade do manitol na pele depois de 90 minutos de tratamento. Este aumento foi 2,6 vezes maior do que o observado quando o LFU foi aplicado na ausência do SLS. Em adição, a densidade de energia mínima necessária para causar desestruturação na pele diminuiu de 141 J/cm^2 para 18 J/cm^2 com a inclusão do SLS no meio de acoplamento. Mitragotri et al. (2000b) demonstraram ainda que o aumento na permeabilidade da pele foi proporcional a concentração de SLS no meio de acoplamento na faixa de 0 a 1% (p/v), sendo também proporcional à diminuição da frequência e aumento do tempo de exposição ao ultrassom.

Em um estudo seguinte, Tezel et al. (2002) avaliaram o sinergismo entre LFU (20 kHz) e vários tensoativos, sendo eles alcanos lineares com 8 a 16 carbonos e diferentes cargas (aniônicos, catiônicos e não iônicos). De modo geral, foi observado que os tensoativos iônicos estudados foram mais efetivos que os tensoativos não iônicos em aumentar a permeabilidade da pele. Em adição, os autores concluíram que o comprimento ótimo da cadeia de hidrocarbonetos dos tensoativos que favorece o efeito sinérgico quando aliado ao LFU é de 12 carbonos (Tezel et al., 2002).

Os tensoativos podem afetar a permeabilidade cutânea quando aliado ao ultrassom devido as alterações que provoca no EC e devido as alterações que pode provocar no processo de cavitação. Com relação a este último, os tensoativos podem diminuir a tensão interfacial do meio de acoplamento, tendo efeito na oscilação das bolhas de cavitação: com a diminuição da

tensão interfacial causa aumento na taxa de expansão e diminuição na taxa de compressão das bolhas. Em adição, o tensoativo pode estabilizar as bolhas de cavitação formadas inibindo a coalescência, portanto, levando a uma maior população de bolhas pequenas (Lee et al., 2005). Na concentração de 1 % (p/v) de SLS, experimentos têm mostrado que os efeitos mais significantes são resultantes da estabilização das bolhas de cavitação (Lee et al., 2005). Em adição, nessa concentração, há uma diminuição da cavitação transiente, devido à presença de uma população de bolhas de cavitação menos energética. Mitragotri et al. (2000b) usaram folhas de alumínio como membrana para visualizar o efeito da cavitação transiente de forma que o número de bolhas que liberavam energia na superfície da membrana pudesse ser medido pelas marcas que deixavam na folha de alumínio. Observaram que quando uma solução de PBS contendo SLS 1% foi usada ao invés de apenas a solução de PBS como meio de acoplamento, o número de marcas deixadas na folha diminuiu de 73 ± 20 , em 20 s, para 6 ± 4 . Estes autores também observaram que o diâmetro médio das marcas formadas na folha de alumínio diminuiu quando 1% de SLS estava presente no meio de acoplamento. Portanto, ao invés da mudança na atividade cavitacional favorecer o sinergismo entre LFU e SLS, essa associação parece causar a inibição da cavitação no meio de acoplamento, sugerindo que outros mecanismos devem estar associados ao sinergismo entre tensoativos e LFU (Mitragotri et al., 2000b). Desta forma, o principal mecanismo relacionado ao sinergismo observado entre LFU e SLS parece ser a habilidade do LFU aumentar a concentração e dispersão do tensoativo dentro do EC (Mitragotri et al., 2000b). Mitragotri et al., (2000b) realizaram uma série de experimentos onde uma amostra de pele foi colocada em contato com uma solução de tensoativo (1% de SLS) por diversos tempos, entre 1 minuto e 24 horas, seguidos da aplicação simultânea do LFU/SLS por 10 minutos. Os autores observaram que a condutividade da pele diminuía em função do aumento do tempo da mesma em contato com a solução de SLS. Este resultado mostra que o efeito do tratamento LFU/SLS é diminuído com o aumento do tempo de exposição passiva da pele ao tensoativo, sugerindo que o sinergismo é decorrente do aumento da penetração e dispersão do tensoativo dentro da pele induzido pela aplicação do LFU (Mitragotri et al., 2000b). Em suma, os promotores de permeação químicos aumentam a permeabilidade do EC por aumentar a fluidez dos lipídeos do EC, modificar a organização lipídica e diminuir a tortuosidade do EC, aumentar o coeficiente de difusão da pele e aumentar o coeficiente de difusão do meio de acoplamento para a pele. No entanto, as propriedades de barreira da pele inibem a extensão na qual os tensoativos podem se difundir e penetrar passivamente. Portanto, acredita-se que o principal papel do efeito sinérgico entre

LFU e SLS é a habilidade do LFU em aumentar a concentração e dispersão do SLS dentro do EC em curto período de tempo (Polat et al., 2011b).

Existem algumas implicações clínicas na viabilidade do uso do LFU/SLS na liberação transdérmica de fármacos. Tem sido demonstrado que o tempo de tratamento e a densidade de energia requerida para induzir uma desorganização significativa na pele são diminuídos por cerca de uma ordem de magnitude quando o SLS é associado ao LFU (Mitragotri et al., 2000a, Tezel et al., 2002). Isto permite que pacientes sejam tratados em um período de tempo mais curto e com protocolos menos intensos, os quais são extremamente benéficos para o uso clínico do LFU. Por essas razões, a associação de LFU e SLS tem sido utilizada em grande parte dos estudos envolvendo sonoforese.

O sinergismo entre sonoforese com outros promotores de permeação físicos também tem sido avaliado. Estudos iniciais mostraram que a associação de uma injeção de hidrocortisona com HFU (1 MHz), resultou em um efeito superior ao efeito da injeção administrada separadamente, evidenciando o sinergismo existente entre a injeção e o tratamento com HFU (Newman et al., 1958).

Kost et al. (1996) avaliaram o efeito sinérgico entre HFU e eletroporação, que é uma técnica utilizada para aumentar a permeabilidade da pele via aplicação de um campo elétrico de alta voltagem. Neste estudo, foi investigado o transporte da calceína e sulforrodamina B em resposta a pulsos elétricos de 10-150 V (1 ms a cada minuto) associado ao HFU (1 MHz). Os autores observaram que, embora o HFU sozinho não tenha aumentado o transporte dos permeantes, sua associação com a eletroporação aumentou o fluxo da calceína em um fator de 2 e da sulforrodamina B em um fator de 3 comparado ao aumento da permeabilidade induzido pela eletroporação. Em adição, houve uma diminuição no “lag time” de 15 para 9 minutos quando o HFU foi associado à eletroporação (Kost et al., 1996).

Uma série de estudos têm sido desenvolvidos para avaliar os diferentes mecanismos envolvidos na melhora da permeabilidade cutânea resultante da associação do ultrassom com microagulhas (Han; Das, 2015). As microagulhas podem criar poros visíveis na pele, capazes de aumentar sua permeabilidade. Sugere-se que a aplicação do LFU associada às microagulhas leve a formação de bolhas de cavitação nas camadas mais profundas da pele, resultando em uma melhora na permeabilidade maior do que a observada quando se utiliza apenas microagulhas. Chen; Wei e Iliescu, (2010) avaliaram o efeito da aplicação simultânea de microagulhas ocas de 100 µm de comprimento e LFU (20 kHz, 0,5 W/cm², ciclo de trabalho 20%), aderido ao *patch* de microagulhas, na permeação da calceína e da albumina. Com essa combinação, foi observado um aumento de 9 vezes no fluxo da calceína e 12 vezes

no fluxo da albumina comparado a permeação passiva dessas moléculas (Chen; Wei; Iliescu, 2010). Han e Das (2013) usaram dois conjuntos de microagulhas sólidas com comprimento de 1,2 mm e 1,5 milímetros aplicados durante 10 minutos na pele. O LFU (20 kHz e 9-18 W) foi aplicado em seguida na superfície da pele para criar cavitação inercial por mais 10 min. Como resultado, houve um aumento de aproximadamente 6 e 9 vezes na permeabilidade da albumina quando microagulhas de 1,5 e 1,2 mm foram utilizadas em associação com o LFU respectivamente, em relação a permeação passiva do fármaco. O aumento da permeação da albumina resultante da associação dos métodos físicos também foi maior que quando os dois métodos foram usados separadamente (Han; Das, 2013).

O tipo mais comum de promotor físico que tem sido estudado em associação ao ultrassom é a iontoforese. A iontoforese é uma técnica física, não-invasiva, utilizada para melhorar e controlar a liberação transdérmica de fármacos através da aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade ($0,5 \text{ mA/cm}^2$) na pele, promovendo a permeação de fármacos carregados e não carregados (Kalia et al., 2004). Le; Kost e Mitragotri (2000) avaliaram o sinergismo de LFU (20 kHz e meio de acoplamento contendo 1 % (p/v) de SLS ou cloreto de dodecil piridinium) com iontoforese aplicada na densidade de energia de $0,45 \text{ mA/cm}^2$, utilizando heparina como fármaco modelo (Le; Kost; Mitragotri, 2000). Os autores observaram que o aumento da permeabilidade resultante da associação dos métodos físicos foi 2 vezes maior do que quando cada método foi usado separadamente. Os autores concluíram que o efeito sinérgico foi significativo porque aumentou a permeação do fármaco (macromolécula) e possibilitou a redução da densidade de corrente elétrica requerida para alcançar o fluxo desejado. Entre os mecanismos envolvidos no efeito sinérgico da associação entre LFU e iontoforese pode-se citar a desorganização do EC causada pelo ultrassom seguida pelo aumento do fluxo eletromigratório ou eletrosmótico devido à iontoforese (Hikima et al., 2009, Watanabe et al., 2009).

Recentemente, a associação de LFU e outros promotores tem sido avaliada em estudos clínicos (Dakowicz et al., 2005, Dudelzak et al., 2008, Spierings; Brevard; Katz, 2008). Spierings; Brevard e Katz (2008) avaliaram a habilidade do LFU na forma de um dispositivo aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), o Sonoprep®, para atuar sinergicamente com a iontoforese na liberação do anestésico lidocaína. O estudo mostrou que o pré-tratamento da pele usando Sonoprep® seguido pela aplicação de iontoforese por 2 minutos resultou em efeito anestésico similar ao induzido pela aplicação de 10 minutos de iontoforese (Spierings; Brevard; Katz, 2008).

Em suma, o uso do LFU associado a promotores químicos e físicos representa uma alternativa atrativa para a liberação transdérmica de fármacos.

2.2.2.6. Aplicações de LFU: liberação de macromoléculas e nanopartículas

A permeação cutânea de macromoléculas por sonoforese tem sido estudada, quase em sua totalidade, utilizando o LFU em detrimento ao HFU. A permeação de proteínas com alto peso molecular como insulina e IFN- γ , de fibras, biopolímeros, oligonucleotídeos e mesmo vacinas já foram estudadas (Polat; Blankschtein; Langer, 2010). No entanto, a proteína mais estudada em relação à liberação transdérmica com LFU tem sido a insulina, devido sua implicação no tratamento da diabetes (Mitragotri; Kost, 2001, Tezel; Sens; Mitragotri, 2003, Kushner, Blankschtein; Langer, 2007).

Os primeiros estudos conduzidos por Tachibana (1992) mostraram a viabilidade da liberação transdérmica de insulina. Logo após, Mitragotri; Blankschtein e Langer (1995) mostraram que a liberação de insulina através da pele de camundongos sem pelo pré-tratada com LFU a 20 kHz foi tão efetiva em diminuir os níveis de glicose de ratos diabéticos para níveis normais quanto uma injeção subcutânea de glicose.

Uma área que recentemente tem ganhado bastante atenção é a vacinação transdérmica. A liberação transdérmica de fármacos pode agir como adjuvante no processo da vacinação, uma vez que pode direcionar antígenos para as células de Langerhans presentes na epiderme, desencadeando assim uma resposta imune (Karande; Mitragotri, 2010). Em adição, tem sido demonstrado recentemente que o LFU pode atuar como adjuvante, desencadeando uma resposta imune quando aplicado na pele mesmo na ausência de antígeno (Tezel et al., 2005). Estudos têm demonstrado que a liberação transdérmica de 1,3 μ g toxóide tetânico a 150 kDa através da pele pré-tratada com LFU a 20 kHz foi capaz de desencadear uma resposta imune similar a resposta imune desencadeada em camundongos após a injeção intramuscular de 10 μ g da toxina (Tezel et al., 2005).

Outra interessante área de pesquisa é o uso do LFU para a liberação transdérmica de nanocarreadores, que podem ser usados para direcionar a liberação de fármacos. Desta forma, diversos grupos de pesquisa têm mostrado a habilidade de LFU liberar diversas nanopartículas de até 100 nm através do estrato córneo, a barreira primária da pele, dentro da epiderme viável e derme (Paliwal; Menon; Mitragotri, 2006, Lee et al., 2010, Seto et al., 2010, Lopez et al., 2011).

Especificamente, Lopez et al. (2011) mostraram que o tratamento da pele com LFU aumentou significativamente a penetração de quantum dots principalmente catiônicos, seguidos dos não iônicos e aniônicos, todos com tamanho na faixa de 10 a 20 nm. No entanto, esse estudo também mostrou que o aumento do potencial zeta positivo da dispersão de quantum dots não é necessariamente ideal, uma vez que os quantum dots que mostraram maior penetração não foram os que possuíam maior carga catiônica, sugerindo que existe uma carga positiva ótima, necessária para a liberação de partículas através da pele pré-tratada com LFU. Outros estudos também têm mostrado a viabilidade em liberar lipossomos, com tamanho médio de 100 nm através da pele pré-tratada com LFU (Dahlan; Alpar; Murder, 2009), além da viabilidade em liberar partículas tão grandes quanto 25 μm . No entanto, a histologia dessas amostras de pele mostrou aberturas na superfície da pele, provavelmente como resultado das altas amplitudes muito altas utilizadas nesse estudo (Weimann; Wu, 2002). Portanto, com mais pesquisas nesta área, pode-se projetar nanocarreadores para serem administrados através da pele tratada com LFU, para aplicações por exemplo na vacinação transdérmica, na administração de fármacos para o tratamento de doenças de pele ou até mesmo para a liberação sistêmica de fármacos.

No entanto, o uso clínico do LFU está apenas no começo de seu desenvolvimento, com poucas aplicações em pacientes devido ao curto espaço de tempo em que tem sido estudado, embora tecnologias usando tanto LFU quanto HFU estão sendo utilizadas de forma crescente.

Neste contexto, estudos recentes têm focado sua atenção em estratégias para aumentar a formação e melhorar a distribuição das *LTRs* na superfície da pele. Em 2001, Terahara; Mitragotri e Langer adicionaram resinas porosas ao meio de acoplamento, que atuaram como núcleos de cavitação aumentando o efeito do LFU no aumento da permeabilidade da pele (Terahara; Mitragotri ; Langer, 2002). Mais tarde, em 2010, Wolloch e Kost avaliaram a influência da adição de micropartículas de sílica no meio de acoplamento, na formação de ondas de choque e microjatos líquido, demonstrando uma contribuição da micropartículas sólidas na criação de mais microjatos líquidos formados após o colapso das bolhas de cavitação próximo a superfícies sólidas das micropartículas (Wolloch; Kost, 2010). Schoellhammer et al. (2012) avaliaram a associação de HFU (1 – 3 MHz) e do LFU (20 – 60 kHz) na melhora da eficácia do tratamento com LFU. Os autores hipotetizaram que a aplicação de um segundo ultrassom, o de alta frequência, orientado paralelamente a superfície da pele, iria nuclear uma maior quantidade de bolhas de cavitação do que o LFU sozinho. O maior número de bolhas deveria cavar e colapsar em resposta as ondas acústicas geradas

pelo LFU, orientado perpendicular as superfície da pele, aumentando assim a formação de *LTRs* (Figura 20).

Figura 20: Diagrama esquemático do aparelho que utiliza dois transdutores de ultrassom com frequências diferentes. a) A sonda do HFU produz um grande número de pequenas bolhas que são transmitidas para o campo de ação do LFU. b) As bolhas nucleadas pelo HFU vão crescer sob a influência do LFU. c) Ao aproximar-se da pele, as bolhas começam a oscilar de forma não linear e colapsar na direção da superfície da pele, formando os microjatos líquidos.

Os autores encontraram que a área de *LTRs* resultante foi significativamente maior nas amostras tratadas simultaneamente com HFU e LFU, comparado as amostras tratadas apenas com LFU, com uma área de *LTRs* cobrindo aproximadamente 27% da superfície da pele. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados, para um melhor entendimento dos parâmetros que afetam a formação das *LTRs* com LFU.

Recentemente, Schoellhamer et al. (2015) exploraram uma configuração experimental fisiologicamente relevante para permitir a utilização desta técnica *in vivo*. A aplicação simultânea do HFU (1 MHz) e LFU (20 kHz) mostrou um aumento na formação de *LTRs* tanto *in vitro* como *in vivo*, diminuindo o tempo necessário para alcançar o grau de ruptura do EC desejado, comparado ao uso do LFU sozinho. Além disso, as *LTRs* geradas através do tratamento com HFU e LFU foram consideradas mais permeáveis do que as geradas quando o pré-tratamento da pele foi realizado apenas com LFU. No que se refere à segurança, o tratamento com HFU e LFU tanto *in vitro* como *in vivo* não resultaram em perturbação da pele maior do que a observada na pele tratada apenas com LFU, que é uma modalidade aprovada pelo FDA. Este estudo demonstrou que a associação do HFU e LFU é

mais eficaz do que o uso do LFU sozinho no aumento da permeabilidade cutânea além de ser bem tolerado *in vivo*.

Embora resultados promissores tenham sido encontrados por Shoellhamer et al. (2012) e Shoellhamer et al. (2015) com a associação do HFU (1 MHz) e LFU (20 kHz), o uso desta metodologia implica no desenvolvimento de um dispositivo complexo, que pode gerar altos custos. Desta forma, um dos objetivos do presente trabalho é aumentar a formação e distribuição das LTRs na superfície da pele através de simples modificações no meio de acoplamento, estratégia que tem sido pouco explorada.

3. Objetivo

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma estratégia simples e de fácil aplicação, capaz de aumentar a formação e melhorar a distribuição das LTRs na superfície da pele quando o LFU é aplicado e, com ela, aumentar a eficiência do tratamento tópico do carcinoma de células escamosas.

3.1. Objetivos específicos

- Desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas com doxorrubicina (NLS-DOX),
- Desenvolver hidrogel enriquecido com a dispersão aquosa de NLS-DOX,
- Avaliar o efeito de vários meios de acoplamento na formação e distribuição das LTRs
- Avaliar *in vitro* a penetração da DOX na pele pré-tratada com LFU e os diferentes meios de acoplamento,
- Avaliar *in vitro* a penetração da calceína na pele pré-tratada com LFU e os diferentes meios de acoplamento,
- Avaliar *in vitro* e *in vivo* a segurança da aplicação do LFU na pele,
- Avaliar *in vivo* o efeito do pré-tratamento com LFU, utilizando nanogel como meio de acoplamento, no tratamento do carcinoma de células escamosas.

4. Material e Métodos

4.1. Material

- Ácido esteárico - (Sigma-Aldrich)
- Monoleína (Myverol[®] 18-92K – produto obtido da glicerólise do óleo de girassol, com a seguinte composição: glicerídeos totais 96,4%, glicerol livre 0,1% - (Kerry do Brasil)
- Brometo de cetiltrimetil amônio – CTAB (Vetec)
- Lauril sulfato de sódio – SLS (Sigma-Aldrich)
- Poloxamer 407[®] - (Embrafarma)
- Quitosana (médio peso molecular) - (Sigma-Aldrich)
- Natrosol 250 HHR - (Galena)
- Polímero carboxivinílico - Carbopol 940 – (Mapric)
- Cloridrato de Doxorubicina – DOX (Zodiac)
- Calceína - (Sigma-Aldrich)
- Allura Red AC - (Sigma-Aldrich)
- Sais para o preparo de tampão fosfato isotônico (PBS): (0,01 M de fosfato e 0,137 M de NaCl) - (Synth)
- HEPES - ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanosulfônico - (J.T Baker)
- Linhagem de célula - carcinoma de células espinhosas A431- (ATCC)
- Meio de cultura Dulbecco's - (Gibco)
- Acetonitrila e isopropanol (grau cromatográfico) - (J.T Baker)
- Água deionizada (Direct-Q UV3) foi usada no preparo de todas as soluções

4.1.1. Pele

As peles utilizadas como membrana nos experimentos *in vitro* foram obtidas de orelhas de porco coletadas imediatamente após o abate do animal e previamente ao procedimento de escaldagem (Frigorífico Olhos d'água - Ipuã- SP). As orelhas foram mantidas a aproximadamente 4°C enquanto transportadas ao laboratório onde foram dissecadas e armazenadas a -70°C por no máximo até 6 meses.

4.1.2. Animais de laboratório

Camundongos nude BALB/c imunodeficientes (12 a 16 semanas, 18-20 g) foram adquiridos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)-SP. Os camundongos foram armazenados a 20-24°C, em caixas esterilizadas mantidas em estantes ventiladas com fornecimento de ar filtrado, densidade populacional de 2 animais/454 cm² (dimensões da caixa = 27,5 (L1) x 16,5 (L2) x 12,5 cm (A), alimentados com comida e água estéreis. Os animais foram expostos diariamente a ciclos claro - escuro (12/12 horas) com o ciclo claro iniciando-se às 6 horas a.m. conforme as normas éticas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto. Os estudos realizados foram aprovados por este Comitê de Ética (Processo nº 11.1.727.53.1 – anexo 1).

4.2. Métodos

4.2.1. Quantificação da DOX por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Estudos de quantificação da DOX livre foram realizados de acordo com o método padronizado por Taveira et al. (2014). Para isso, utilizou-se um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo LC10-AD), composto por bombas (LC10-AT), injetor automático (modelo 9SIL-10AD), forno (modelo CTO-10SA), coluna Lichrosphere 100 RP-18 (5µm x 125 mm x 4mm) e pré-coluna (5µm x 10 mm x 4mm), acoplado a um detector de fluorescência (modelo RF-10AX) e a um computador equipado com programa de análise cromatográfica CLASS-VP. A fase móvel foi composta por tampão fosfato (50 mM pH=2), acetonitrila e isopropanol (65:25:2) (v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 100 µL, forno a 35°C e intensidade de fluorescência 480/560 nm (excitação/emissão).

DOX apresentou tempo de retenção de 3,4 min e uma curva de calibração linear ($123.1x + 2878,3$; $r = 0,9998$) na faixa de concentrações de 250-8000 ng / mL. A precisão intra e inter-dia e exatidão do método apresentaram um coeficiente de variação (CV%) e um erro relativo (% E) não superior a 4,2% e 4,4%, respectivamente. DOX encapsulada em NLS mostrou dois picos quando submetida às condições cromatográficas descritas acima: primeiro pico em 3,4 min e o segundo em 7,4 min. A soma das áreas dos dois picos foi utilizada para construção da curva de calibração, que foi linear ($y = 36577 + 809.47x$; $r = 0,9999$) na faixa de concentrações de DOX de 250-8000 ng / mL. A precisão intra e inter-dia e exatidão do método apresentaram CV% e E% não superior a 8,5% e 13,5%, respectivamente.

A seletividade do método foi investigada para SLNs, "epiderme viável" (pele sem EC) e EC removido com fita adesiva (Durex[®] 18 mm, Manaus-AM). Não foi observada interferência no tempo de retenção de DOX, indicando a especificidade do método.

4.2.2. Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) pelo método da Microemulsão (ME)

4.2.2.1. Determinação da razão entre os componentes necessária para a formação da microemulsão

Diagrama de fases pseudo-ternário

O diagrama de fases pseudo-ternário foi construído na ausência da DOX para identificar a região de formação de microemulsões que dariam origem as NLSs. Ácido esteárico foi usado como fase oleosa, CTAB como tensoativo, monoleína como co-tensoativo e água destilada como fase aquosa. Inicialmente, a razão entre o tensoativo (TA) e o co-tensoativo (co-TA) foi determinada com base no equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) requerido pela fase oleosa ($EHL = 15$), e aquele apresentado pelo CTAB ($EHL = 21,4$) e pela monoleína ($EHL = 3,8$), de acordo com a equação II:

Equação II

$$A+B=1$$

$$EHL_{requerido\,fase\,oleosa} = Ax EHL_A + Bx EHL_B$$

Onde: A e B refere-se à porcentagem de monoleína e CTAB, respectivamente, EHL_A ao equilíbrio hidrófilo-lipófilo da monoleína e EHL_B ao equilíbrio hidrófilo-lipófilo do CTAB.

Desta forma, a mistura TA/coTA inicialmente utilizada continha 2 partes de CTAB para 1 parte de monoleína. Foi construído então um diagrama de fases pseudo-ternário contendo ácido esteárico, CTAB/monoleína (2:1) e água para determinação da região de formação de microemulsões. Optou-se por não construir o diagrama completo, mas apenas parcial (Figura 21). Isto porque a faixa de composição estudada é considerada adequada para a obtenção de NLS (Wissing; Kayser; Muller, 2004). As formulações foram preparadas aquecendo-se a fase oleosa (ácido esteárico e monoleína) e a fase aquosa (água e CTAB), separadamente, até aproximadamente 90°C. A fase aquosa foi então vertida na fase oleosa e o sistema mantido sob agitação a quente. A região de microemulsão foi caracterizada pela

formação de formulações transparentes e de baixa viscosidade (Mangdawgade; Patravale, 2008), correspondendo as formulações 25, 26 e 27 do diagrama pseudo-ternário (Figura 21). Essas formulações foram então utilizadas para a obtenção das NLS.

Figura 21: Diagrama pseudo-ternário parcial do sistema ácido esteárico/CTAB: monoleína/água.

4.2.2.2. Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

As NLS foram obtidas pelo método da microemulsão proposto por Gasco, (1993). Baseado nos resultados do diagrama de fases (Figura 21), foram preparadas microemulsões contendo quantidades apropriadas de lipídeo, tensoativo e co-tensoativo, correspondendo às formulações 25, 26 e 27 do diagrama de fases (Figura 21). As formulações selecionadas continham 40/20/40, 50/20/30 e 60/20/20 de ácido esteárico, CTAB/monoleína (2:1) e água, respectivamente. A microemulsão obtida conforme descrito no item anterior foi vertida por gotejamento em água gelada (2-5°C) na proporção de 1:40 (microemulsão:água gelada) sob vigorosa agitação (Ultra-Turrax T-25) de 20.000 rpm por 10 minutos (Taveira et al., 2012). A dispersão de NLS final, sem espuma, foi então submetida à homogeneização a alta pressão (homogeneizador de alta pressão Emulsiflex[®] C3-Avestin) a 500 bar por 5 minutos.

Para selecionar as melhores NLS, as quais foram resultantes das microemulsões obtidas (formulação 25, 26 e 27), as NLS foram caracterizadas em relação ao tamanho médio, índice de polidispersividade (PdI) e potencial zeta conforme descrito no item 4.3. A NLS com menor tamanho médio e PdI foi selecionada para o estudo do efeito da proporção de TA/co-TA (item 4.2.2.3). Esta continha 40/20/40 de ácido esteárico, CTAB/monoleína e água, respectivamente (formulação 25 do diagrama de fases).

4.2.2.3. Efeito da proporção de tensoativo/co-tensoativo nas características físico-químicas das NLS

Para avaliar a influência da proporção de tensoativo/co-tensoativo no tamanho médio, PDI e potencial zeta das partículas, NLS foram preparadas com 40% de lipídeo e 20% de tensoativo/co-tensoativo, mas variando-se as proporções entre CTAB/monoleína: 2:1, 1:1, 1:0, 0:1 e 1:2. O tamanho de partícula, PDI e potencial zeta foram determinados conforme descrito no item 4.3.

4.2.2.4. Obtenção das NLS contendo DOX (NLS-DOX)

Para a obtenção das NLS com DOX (NLS-DOX), NLS contendo 40% de ácido esteárico, 20% de CTAB e monoleína na proporção de 1:2 e 40% de água foram selecionadas com base nos estudos realizados no item 4.2.2.3. A DOX foi adicionada a mistura de lipídeos fundida antes da formação da microemulsão em diferentes porcentagens (1,0%, 2,0%, 3,0% e 4,0%) em relação à quantidade de ácido esteárico (Taveira et al., 2012).

4.3. Caracterização das NLS

4.3.1. Tamanho médio, PDI e Potencial Zeta das dispersões de NLS

Espectroscopia de correlação de fótons (PCS) foi utilizada para determinar o tamanho médio e o PDI das NLS. As amostras foram diluídas (1:10) em água destilada e mantidas sob agitação até o momento da análise, sendo analisadas utilizando um Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, UK) a 25°C. As análises foram realizadas em triplicata.

O potencial zeta foi determinado baseando-se na mobilidade eletroforética das NLS utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, UK). As amostras foram diluídas (1:10) em água destilada e as análises foram realizadas a 25°C em triplicata.

4.3.2. Microscopia de força atômica (MFA)

A morfologia das NLS-DOX foi observada utilizando um microscópio de força atômica. As amostras foram preparadas imergindo a mica (Muscovite Mica Substrates sheets, SPI Supplies[®]) recém-clivada na dispersão aquosa de NLS. A seguir, as amostras foram armazenadas a temperatura ambiente por uma noite para secagem completa. A imagem das amostras foi realizada por varredura da superfície da mica em 2 µm x 2 µm de área usando um cantilever com 1,4 Hz de frequência de ressonância. Todas as imagens foram realizadas a

temperatura ambiente e a imagem de fase e topologia foram utilizadas para determinar a morfologia das NLS-DOX.

4.3.3. Análise da interação da DOX com os componentes da formulação

Com base no aparecimento de um segundo pico no cromatograma nos experimentos de quantificação da DOX encapsulada em NLS (item 4.2.1), e sabendo-se que este fármaco interage fortemente com lipídeos aniônicos, estudos da interação da DOX com os componentes da formulação foram realizados para melhor caracterizar as dispersões. Para isso, os componentes da formulação e a DOX foram combinados da seguinte forma: (I) DOX + CTAB, (II) DOX + ácido esteárico, (III) DOX + monoleína, (IV) DOX + CTAB + ácido esteárico, (V) DOX + CTAB + monoleína, (VI) DOX + ácido esteárico + monoleína e (VII) mistura física da DOX na dispersão aquosa de NLS. Todas as combinações foram preparadas segundo o método de preparação das NLS-DOX (item 4.2.2.4). O perfil cromatográfico de cada dispersão diluída em metanol, resultando em concentração teórica de 8000 ng/mL de DOX, foi obtido nas mesmas condições utilizadas para a quantificação cromatográfica da DOX (item 4.2.1).

4.3.4. Coeficiente de partição da DOX e da NLS-DOX

Para avaliar qualitativamente alterações nas características físico-químicas da DOX quando encapsulada na NLS, estudos de partição da DOX e da NLS-DOX foram realizados utilizando clorofórmio e acetato de etila como solventes orgânicos. Para isso, 500 µL da solução de DOX ou da dispersão aquosa de NLS-DOX foram adicionados a 1 mL de solvente orgânico. As amostras foram agitadas em agitador de tubos seguidas de repouso até separação das fases. Após, as soluções aquosa e orgânica foram avaliadas visualmente para identificação macroscópica da distribuição da DOX, uma vez que a mesma apresenta coloração vermelha em solução.

4.3.5. Determinação da quantidade total e porcentagem de perda do fármaco na NLS

Para a determinação da quantidade de DOX perdida nas várias etapas do processo de obtenção das NLS-DOX, a DOX total presente na dispersão final de NLS foi determinada a partir da dissolução das NLS em etanol em diluição apropriada e a quantificação da DOX foi feita por espectrofotometria UV em um espectrofotômetro (UV spectrophotometer 1800

Shimadzu) no comprimento de onda de 480 nm. A porcentagem de perda do fármaco foi então determinada com base na equação III (Souza et al., 2011a, Taveira et al., 2012):

Equação III

$$\% Perda = 100 - \left(\frac{DOX_{dispersão\ final}}{DOX_{adicionada}} \times 100 \right)$$

Onde: %Perda é a porcentagem de fármaco perdida durante o processo de obtenção da dispersão de NLS em relação à quantidade de DOX adicionada no início do processo.

4.3.6. Eficiência de Encapsulação (%EE)

Dispositivos de ultracentrifugação AMICON Ultra 4 (Millipore, 100 Kda) foram utilizados para determinar a EE. Este dispositivo dispõe de dois compartimentos separados por uma membrana de filtração com porosidade de 100 KDa, de modo que a fração de DOX encapsulada fica retida na membrana e a fração livre é coletada no compartimento inferior do dispositivo, conforme metodologia padronizada por Taveira et al., 2012). Na parte superior do dispositivo foi adicionado 1 mL da dispersão de NLS e, em seguida, foi realizada a centrifugação a 1605 g por 40 minutos a 25°C. A fração de DOX livre foi então coletada no compartimento inferior para análise por espectrofotometria de UV-Vis no comprimento de onda de 480 nm, obtendo-se a quantidade de fármaco livre na dispersão. A curva linear de calibração em água ($y = 0,0146x + 0,0657$, $r^2 = 0,9918$) foi obtida na faixa de concentração de 10 a 60 µg/mL. A quantidade encapsulada do fármaco ($Q_{encapsulada}$) foi determinada a partir da diferença entre a quantidade total (Q_{total}) e a quantidade livre (Q_{livre}) do fármaco na dispersão ($Q_{encapsulada} = Q_{total} - Q_{livre}$). Para a determinação da quantidade total de DOX, a NLS foi solubilizada em etanol na proporção de 1:7 (NLS-DOX:etanol) e quantificada por Uv-Vis no comprimento de onda de 480 nm utilizando-se a curva linear de calibração em água etanol ($y = 0,0161x + 0,0685$, $r^2 = 0,9929$), obtida na faixa de concentração de 10 a 60 µg/mL. A eficiência de encapsulação foi calculada baseada na equação IV (Taveira et al., 2012):

Equação IV

$$\% EE = \left(\frac{DOX_{dispersão\ NLS} - DOX_{livre}}{DOX_{dispersão\ NLS}} \right) \times 100$$

4.3.7 Capacidade de carga (%CC)

A capacidade de carga relaciona a quantidade de fármaco encapsulada ($DOX_{dispersãoNLS} - DOX_{livre}$) em relação à quantidade de lipídeos ($Q_{lipídeos}$) utilizada na obtenção da NLS, e foi calculada de acordo com a equação V (Souza et al., 2011a):

Equação V

$$\%CC = \left(\frac{DOX_{dispersãoNLS} - DOX_{livre}}{Q_{lipídeos}} \right) \times 100$$

4.4 Obtenção de hidrogel enriquecido com a dispersão aquosa de NLS-DOX (nanogel NLS-DOX)

As NLS foram incorporadas em gel de poloxamer 407, copolímero poli-(óxido de etileno)/poli-(óxido de propileno)/poli-(óxido de etileno). Para a obtenção do gel, o polímero poloxamer (40%) foi solubilizado a frio em água destilada (5°C). Esta dispersão foi mantida sob agitação constante até a completa dispersão do polímero e mantida em refrigerador a 4°C por 24 horas para garantir esta dispersão (Gratieri, et al., 2010). Como o gel de Poloxamer apresenta estruturas líquido-cristalinas, como será mostrado posteriormente, ele foi denominado de nanogel.

Para a obtenção do nanogel NLS-DOX, a dispersão aquosa de NLS-DOX, obtida como descrito no item 4.2.2.4 (com 4% de DOX em relação ao ácido esteárico), foi adicionada ao gel de Poloxamer (nanogel) na proporção de 1:1 (NLS-DOX:nanogel) sob agitação constante, resultando no nanogel NLS-DOX na concentração final de 20% (p/v) de poloxamer 407. A concentração teórica dos componentes no nanogel foi de 0,4 mg/mL de DOX, 19,0 mg de ácido esteárico, 3,3 mg/mL de CTAB e 6,2 mg/mL de monoleína, ou seja, metade das concentrações que compunham a dispersão aquosa de NLS. Para a preparação do nanogel contendo DOX livre (nanogel-DOX), esta foi adicionada diretamente ao hidrogel de poloxamer 20% (p/v) recém-preparado, ainda em banho de gelo e sob agitação constante, resultando na mesma concentração de DOX apresentada pelo nanogel NLS-DOX.

Após preparo, tanto o nanogel quanto o nanogel-DOX e o nanogel NLS-DOX, foram mantidos em refrigerador por 24 horas antes da administração para estabilização do sistema (Silva et al., 2012, Gratieri et al., 2010). Após 24 horas, os nanogéis foram caracterizados em relação ao tamanho médio de partículas e potencial zeta conforme descrito no item 4.3.

4.5. Caracterização do nanogel

4.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície do nanogel, do nanogel NLS-DOX e da dispersão aquosa de NLS-DOX foi caracterizada por MEV (Carl Zeiss, EVO 50). Uma gota de cada amostra foi colocada em uma lâmina de vidro. Depois da secagem a temperatura ambiente, as amostras foram revestidas com ouro utilizando um pulverizador de ouro (Bal-Tec, SCD 050 Sputter Coater) e analisadas a uma voltagem de 20 kV. As análises foram realizadas a 25 °C, 24 horas após o preparo das formulações.

4.5.2. Microscopia de luz polarizada

Para avaliação da formação de fases cristalinas, o nanogel, o nanogel NLS-DOX e a dispersão aquosa de NLS-DOX foram analisados em microscópio óptico Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com filtro polarizador e acoplado a câmera digital AxioCAN HRC (Carl Zeiss AG, Alemanha) com sistema de vídeo e aquisição automática de imagem. Aproximadamente 10 µL das formulações foram depositados em lâminas de vidro e cobertas com lamínulas. As análises foram realizadas a 25°C, 24 horas após o preparo das formulações.

4.5.3. Difração de raios X a baixo ângulo (SAXS)

No intuito de determinar os tipos de estruturas líquido-cristalinas formadas na dispersão de NLS, NLS-DOX, nanogel e nanogel NLS-DOX, essas formulações foram analisadas por medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). Os nanosistemas foram analisados no Laboratório de cristalografia, no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP), com a colaboração da Profa. Dra. Márcia Carvalho de Abreu Fantini.

As medidas do ângulo de espalhamento 2θ foram realizadas utilizando $\lambda = 0,1608$ nm. As medidas de intensidade foram realizadas em função do vetor de espalhamento q ($q = (4\pi \sin \theta) / \lambda$). As amostras foram acondicionadas em capilares de vidro, com diâmetro interno de 1,5 mm. As análises foram realizadas em um detector de filamentos bidimensional, por um período de 600 segundos. Os resultados experimentais foram corrigidos pela resposta do detector. As estruturas líquido-cristalinas foram identificadas através da lei de Bragg, calculando os valores das distâncias interplanares, d . A simetria da estrutura foi determinada associando-se a distância interplanar e o parâmetro de rede.

4.5.4. Análise reológica

As medidas reológicas foram realizadas em um reômetro tipo Cone & Placa (Brookfield R/S Plus PTR-I), acoplado ao cone P50-1. As propriedades reológicas dos nanogéis contendo ou não NLS foram investigadas por cisalhamento contínuo e o seu comportamento foi avaliado plotando-se a taxa de cisalhamento [1/s] em função da tensão de cisalhamento [Pa]. O tempo de análise foi de 30 segundos para a curva ascendente e 30 segundos para a curva descendente. As leituras para a obtenção dos dados foram realizadas de 1 em 1 segundo em um total de 30 leituras. Foram obtidos os valores de viscosidade média, calculada pela tangente da curva de tensão de cisalhamento (Pa) pela velocidade de cisalhamento (1/s), e de índices de fluxo, calculados com base no modelo de Herschel-Bilkley, conforme Equação VI (Aulton, 2005).

Equação VI

$$\sigma = \sigma_y + K\gamma^n - 1$$

Onde σ e σ_y correspondem à tensão de cisalhamento e a tensão de cedência de Bingham, respectivamente, K é um coeficiente de viscosidade (calculado a partir de um líquido com viscosidade conhecida), γ é a velocidade de cisalhamento e n o índice de fluxo.

As amostras foram analisadas a 25°C, 24 horas após o preparo das formulações.

4.6. Estudos *in vitro* de liberação da DOX a partir das NLS-DOX, do nanogel NLS-DOX e do nanogel-DOX

Foram utilizadas células de difusão vertical tipo “Franz” (Hanson Research Corporation, modelo sistema Microette Plus® 58-001-801) e membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose (PM 12000 a 40000). Esta célula de difusão (área difusional de 1,86 cm²) é composta por dois compartimentos, um doador e outro receptor. No compartimento doador, na metade superior da célula, foram adicionados 300 µL da formulação (NLS-DOX, nanogel NLS-DOX ou nanogel-DOX) correspondendo à quantidade teórica de aproximadamente 180, 91 e 400 µg de DOX respectivamente, sendo que a concentração exata da DOX na formulação foi determinada antes de cada estudo de liberação por espectrofotometria UV/VIS. Como solução receptora foi utilizado tampão HEPES (25 mmol/L HEPES, 133 mmol/L NaCl) pH 7.4, mantido a temperatura de 25°C (± 2,0°C), sob agitação de 300 rpm. Foram coletados 1 mL de amostra deste compartimento de tempos em tempos ao longo de 26 horas de experimento. O mesmo volume de solução receptora foi retornado para o compartimento em questão após cada coleta. As amostras coletadas foram analisadas por CLAE (item 4.2.1).

O coeficiente de difusão (D) da DOX foi calculado usando a equação VII (Araujo et al., 2010, Merclin; Bramer; Edsman, 2004).

Equação VII

$$Q = 2C_0 \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi}}$$

Onde Q é a quantidade de fármaco liberada por unidade de área, C_0 é a concentração inicial do fármaco na formulação e t é o tempo decorrido desde o início do experimento.

Para a realização dos cálculos, foi considerado apenas o 1 pico de quantificação DOX por CLAE, uma vez que o segundo pico refere-se a interação da DOX com lipídeos da matrix lipídea.

4.7. Pré-tratamento da pele usando ultrassom de baixa frequência - (LFU)

4.7.1. Preparo da pele

A pele retirada da orelha de porco (item 4.1.1.) foi descongelada, dermatomizada a 700 μm de espessura, o excesso de pêlos aparado e cortada em amostras com aproximadamente 2 cm x 2 cm. Antes da montagem da pele nas células de difusão, graxa de silicone foi aplicada nas bordas do compartimento doador e receptor das células para garantir uma vedação à água adequada entre a borda da pele e a célula de difusão. Para fornecer um suporte mecânico adicional, uma tela de nylon (150 μm *opening nylon mesh-Sefar Lab Pak*, Depew New York) foi colocada na parte superior do compartimento receptor, abaixo da pele. O compartimento receptor foi preenchido com PBS, a amostra de pele foi montada na célula de difusão e o compartimento doador foi preenchido com o meio de acoplamento para o pré-tratamento (Polat et al., 2011b).

4.7.2. Medida de resistividade elétrica da pele (R)

Foi demonstrado que a resistividade elétrica é um indicador do estado estrutural do EC (Tang et al., 2002, Karande, Jain, Mitragotri; 2006). Por isso, a medida de resistividade elétrica foi realizada nas peles antes de todos os experimentos. Para isso, as peles dermatomizadas montadas nas células de difusão foram submetidas a passagem de uma corrente elétrica por meio de um gerador de sinal (modelo 33210A Agilent) e eletrodos de Ag/AgCl (*In Vivo Metrics*) inseridos no compartimento doador e receptor das células. O eletrodo em contato com o meio receptor foi ligado ao gerador de sinal e uma corrente

alternada de 100 mV (RMS) de potência e 10 Hz de frequência foi aplicada. A intensidade da corrente elétrica capaz de atravessar a pele foi então medida por meio do eletrodo inserido no compartimento doador ligado a um multímetro (Minipa ET 2053). A resistência da pele foi calculada utilizando-se a lei de Ohm tomando-se o cuidado de subtrair a resistência do sistema (sem a pele) do valor de resistência do sistema quando a pele estava presente. O valor de resistividade foi obtido multiplicando-se o valor de resistência pela área da pele disponível para permeação ($1,13 \text{ cm}^2$). As peles adequadas para uso, consideradas intactas, apresentaram valor de resistividade $>50 \text{ K}\Omega\cdot\text{cm}^2$ (Polat et al., 2011b).

4.7.3. Pré-tratamento da pele com US

Para os experimentos de pré-tratamento da pele foi utilizado um US (VCX 500 Sonics & Materials, Newtown, CT) operando na frequência de 20 kHz. Como o aparelho não fornece automaticamente a intensidade da frequência aplicada, ela deve ser calculada com base na porcentagem de amplitude disponível no equipamento. A intensidade fornecida quando a amplitude era fixada em 20% foi determinada usando calorimetria. Brevemente, uma garrafa térmica foi preenchida com 1000 mL de água. A sonda do US foi imersa dentro da água e ativada por 5 minutos em um comprimento de pulso de 100% (Figura 22).

Figura 22: Aparato para calibração do US por calorimetria.

A variação de aumento da temperatura da água neste período foi medida e a intensidade do LFU calculada baseada na Equação VIII (Mitragotri et al., 2000a):

Equação VIII

$$I = \frac{m_{\text{água}} \times C_{\text{água}} \times \Delta T}{A \times \Delta t}$$

Onde: I é a intensidade do LFU (W/cm^2), m é a massa da água (1000 g), $C_{\text{água}}$ é o calor específico da água ($4,18 \text{ J/g}^\circ\text{C}$), A é a área do transdutor ($1,33 \text{ cm}^2$), ΔT é a variação da temperatura da água e Δt é o tempo necessário para que ocorresse esta variação (300 segundos).

O pré-tratamento da pele foi realizado utilizando-se condições experimentais idênticas: intensidade $9,6 \pm 0,5 \text{ W}/\text{cm}^2$, ciclo de trabalho 5s ON, 5s OFF. A sonda do ultrassom foi posicionada no compartimento doador, a uma distância de 3 mm da superfície da pele. A pele foi tratada até que sua resistividade elétrica, medida a cada 1 minuto de tratamento, como descrito no item 4.7.2., atingisse o valor desejado de aproximadamente $1 \text{ K}\Omega.\text{cm}^2$ (Farinha et al., 2006). Para minimizar efeitos térmicos, o meio de acoplamento foi substituído após cada minuto de aplicação do LFU, para que a variação da temperatura não excedesse 10°C acima da temperatura inicial do meio de acoplamento. Os meios de acoplamento utilizados no pré-tratamento da pele estão descritos no item 4.7.4. Após o pré-tratamento da pele, as amostras foram lavadas com PBS para remover o excesso do meio de acoplamento da superfície da pele e então, a solução receptora foi renovada e o compartimento doador foi preenchido com a formulação desejada para os estudos de permeação através da pele pré-tratada.

4.7.4. Meios de acoplamento utilizados no pré-tratamento da pele com LFU

Diferentes meios de acoplamento foram investigados para verificar sua influência na formação e distribuição das LTRs:

- I. SLS 1% (p/v) em PBS (PBS+SLS),
- II. CTAB 0,33% (p/v) em PBS (PBS + CTAB),
- III. gel de Poloxamer 407 a 20% (p/v) (nanogel),
- IV. nanogel a 20% (p/v) contendo CTAB 0,33% (p/v) (nanogel + CTAB),
- V. dispersão aquosa de NLS (NLS) (19 mg de lipídeo/mL de dispersão)
- VI. nanogel a 20% (p/v) contendo NLS (nanogel + NLS) (9,5 mg/mL de ácido esteárico, 1,67 mg/mL de CTAB e 3,09 mg/mL de monoleína)
- VII. hidrogel de quitosana 1,5% (p/p),

VIII. hidrogel de hidroxietilcelulose (natrosol 250HHR) a 1,0 % (p/p),

IX. hidrogel de carbopol 940 a 0,25% (p/p).

Todas as dispersões utilizadas como meio de acoplamento foram caracterizadas quanto ao tamanho médio de partículas, PDI e potencial zeta, como descrito no item 4.3.1, quanto ao comportamento reológico, como descrito no item 4.5.4., e quanto a tensão interfacial, como descrito a seguir:

A tensão interfacial/superficial (γ) dos meios de acoplamento foi medida a temperatura ambiente, utilizando um tensiômetro (Fisher Scientific, modelo 20) com base no método de Du Nouy, utilizando um anel rígido de platina. Esse método mede a força necessária para deslocar um anel de platina de uma superfície ou interface, com base na Equação IX:

Equação IX

$$F = 2\pi(R1 + R2)\gamma$$

Onde: F é a força de deslocamento e $R1$ e $R2$ são os raios interno e externos do anel (Alton, 2005).

Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). A tensão superficial da água purificada, nesta temperatura foi de $73,3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

4.7.5. Imagem digital e análise da área das regiões localizadas de transporte (*localized transport regions* - LTRs)

Após o pré-tratamento da pele com o LFU e os diferentes meios de acoplamento, todos contendo *allura red* 0,025% (p/v) para corar as LTRs, as amostras de pele foram lavadas com PBS para remover o excesso do meio de acoplamento de sua superfície e então o compartimento doador das células foi preenchido com solução de *allura red* 0,025 % (p/v) em PBS, a qual permaneceu em contato com a superfície da pele pré-tratada por 1 hora. Devido à maior permeabilidade das LTRs, o aumento da captação do *allura red* (corante hidrofílico) ocorre significativamente somente dentro das LTRs, o que auxilia na subsequente imagem digital dessas regiões. Após 1 hora, a solução foi removida do compartimento doador e as amostras de pele foram lavadas com PBS e secas. Imagens da superfície da pele foram então realizadas usando uma câmera digital (Panasonic Lumix, 16.0 megapixels, função auto macro) posicionada a aproximadamente 20 cm acima da pele. As imagens foram processadas usando Adobe Photoshop CS3 utilizando o seguinte protocolo: primeiro, o canal azul da imagem foi isolado, fornecendo melhor contraste para a medida da porção vermelha da pele. O limiar da imagem foi ajustado de modo que somente a porção da pele que foi marcada pelo

corante foi capturada. Uma vez que um limiar apropriado foi encontrado, todas as imagens foram processadas usando o mesmo nível de limiar. A área da imagem ajustada foi então quantificada utilizando *Image J* (National Institute of Health, Bethesda, MD) com a opção “análise de partículas” utilizando tamanho padrão e opção circularidade (Schoellhammer et al., 2012). Os valores reportados foram convertidos de unidades de pixels para milímetros (aproximadamente 9.000 pixels/mm) utilizando *Image J*.

4.8. Estudos de permeação cutânea da DOX

Os estudos de permeação cutânea antes e após o pré-tratamento da pele com ultrassom foram realizados utilizando-se células de difusão vertical tipo “Franz” e pele de orelha de porco dermatomizada (500 μm) como membrana. No compartimento doador foram adicionados 1000 μL do nanogel NLS-DOX correspondendo a aproximadamente 400 μg de DOX. A solução receptora ($\pm 13 \text{ mL}$) foi composta por tampão HEPES pH 7,4 isotonicado com NaCl mantido a temperatura de 25°C ($\pm 2,0^\circ \text{C}$), sob agitação de 300 rpm. Do compartimento receptor foi coletado 1,0 mL de amostra no intervalo de 2 em 2 horas entre 18 e 26 horas após o início do experimento. A DOX presente na solução receptora foi quantificada por CLAE, conforme descrito no item 4.2.1. A penetração da DOX a partir do nanogel-DOX também foi estudada como modelo de fármaco hidrofílico catiônico no transporte sonoforético.

4.8.1. Estudos de retenção da DOX na pele

Após o término dos estudos de permeação cutânea, a pele foi retirada da célula de difusão e o excesso de formulação removido com água destilada. A pele foi então presa a uma superfície lisa com o EC voltado para cima (Figura 23). A região da pele em contato com a formulação foi submetida à técnica do “*tape stripping*”. Nessa técnica, o EC foi retirado utilizando-se 15 fitas adesivas de modo que a remoção do EC foi indicada pelo brilho da face exposta da pele (epiderme viável).

Figura 23: *Tape stripping* do EC para quantificação da DOX retira nesta camada da pele.

Fonte: Adaptado de Nair et al. (2013).

As 15 fitas contendo partes do EC removido foram colocadas em um tubo e o fármaco contido nas fitas foi extraído com 5 mL de metanol e agitação em mixer por 3 minutos. Após esse período, a solução foi filtrada em filtro de fluoreto de vinilideno (PVDF) 0,45 μm (Milipore) e analisada por CLAE para a determinação de DOX presente no EC.

A pele remanescente (epiderme sem EC+derme) foi picotada, colocada em um tubo e o fármaco presente na pele remanescente foi extraído com 5 mL de metanol com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Ultra turrax T25) a 3000 rpm por 1 minuto. Logo após, a amostra foi sonicada por 30 minutos com o objetivo de romper a membrana das células e então submetida à centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. As amostras foram filtradas em filtro de PVDF 0,45 μm (Milipore) e a quantidade de fármaco presente na epiderme sem EC + derme foi analisada por CLAE como descrito no item 4.2.1..

4.9. Estudos de permeação cutânea da calceína

Como modelo de fármaco hidrofílico aniônico, a calceína foi utilizada nos estudos de permeação cutânea após o pré-tratamento da pele com LFU e os meios de acoplamento III, VII, VIII e IX descritos no item 4.7.4. f O compartimento receptor (± 13 mL) foi preenchido com PBS pH 7,4 isotonicado com NaCl e ao compartimento doador foram adicionados 2,5 mL de solução de calceína em PBS (0,2% p/v). Estes experimentos foram realizados a temperatura de 25° C ($\pm 2,0^\circ$ C), sob agitação de 300 rpm por 26 h (Kushner; Blankschtein;

Langer , 2004). Amostras de 1 mL da solução receptora foram coletadas no intervalo de 2 em 2 horas entre 18 e 26 horas após o início do experimento. O volume coletado foi imediatamente substituído pelo mesmo volume de PBS após cada coleta. A concentração de calceína em cada alíquota foi determinada por espectrofotometria (Espectrofotômetro UV 1800, Shimadzu, Japão), no comprimento de onda de 494 nm e a absorbância foi convertida em unidades de % (p/v) usando uma curva analítica obtida a partir das concentrações conhecidas de calceína (Polat et al., 2011b). Utilizando este método de quantificação não foi necessário fazer a correção da absorbância dos lipídeos da pele na solução receptora, uma vez que Polat et al. (2011b) mostraram que o nível de absorção deles não afeta significativamente a quantificação da calceína quando a mesma está presente em concentrações que resultam em absorbâncias maiores do que 0,4 (como foi o caso da mesma nos experimentos realizados).

4.10. Estudos *in vivo*

4.10.1. Padronização do tempo de pré-tratamento da pele *in vivo* usando LFU/nanogel

Foram utilizados camundongos *hairless* (linhagem HRS/J) com idade entre 12 a 16 semanas, sem tumor induzido. Um compartimento de vidro com 1,13 cm² de área aberta foi acoplado à superfície da pele da região dorsal dos camundongos com o auxílio de graxa de silicone (colocada apenas nas extremidades fechadas do compartimento) e preenchido com o nanogel de Poloxamer a 20% (Figura 24). A sonda do LFU foi colocada no interior deste meio de acoplamento e posicionada a uma distância de 3 mm ou de 5 mm da superfície da pele para avaliar o efeito de seu posicionamento na integridade do EC após diferentes tempos de tratamento. O LFU foi aplicado na intensidade de $9,6 \pm 0,5$ W/cm², ciclo de trabalho 5 s ON, 5 s OFF, trocando-se o meio de acoplamento a cada ciclo de 5 s ou após 10 s, 20 s, 30 s ou 60 s de ciclo de trabalho. O tratamento com LFU nessas condições foi realizado sempre até que a resistividade elétrica da pele atingisse o valor de aproximadamente 1 K Ω .cm² (Farinha et al., 2006).

Figura 24: Pré-tratamento da pele *in vivo* utilizando LFU/nanogel.

Para determinar *in vivo* se a resistividade elétrica desejada havia sido atingida adaptou-se o método descrito por Tezel et al. (2005). Resumidamente, a resistividade da pele após cada ciclo de tratamento foi medida com o auxílio de um eletrodo inserido no compartimento de vidro contendo PBS pH 7,4 e um eletrodo de referência preso na cauda do camundongo (*patch* contendo eletrodo da IOMED®). Uma corrente alternada de 100 mV (RMS) de potência e 10 Hz de frequência foi aplicada através do eletrodo inserido no meio de acoplamento e a mesma foi medida no eletrodo de referência ligado a cauda do camundongo e conectado a um multímetro. A resistividade da pele foi calculada usando a Lei de Ohm. Após a pele atingir a resistividade desejada, a mesma foi dissecada do camundongo, montada em uma célula de difusão vertical, e novamente a resistividade foi medida sob as mesmas condições descritas no item 4.7.2. para avaliar a eficiência do protocolo *in vivo* adaptado.

Somente os animais que apresentavam pele com uma resistividade inicial de 60 K Ω .cm² ou mais foram usadas, para assegurar que o EC estava íntegro antes dos experimentos (Tezel et al., 2005).

4.10.2 Indução tumoral em camundongos nude balb/c imunossuprimidos

Empregou-se como modelo celular a linhagem de células de carcinoma escamoso humano (A431). Esta linhagem celular foi obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC – America Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). A linhagem foi mantida sob criopreservação em nitrogênio líquido, utilizando-se solução de congelamento composta por 10% de dimetilsulfóxido e 90% de soro fetal bovino (SFB) inativado. Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, em meio Dubelcco completo (DMEM, pH 7.2-7.4) (Gibco, Grand Island,

USA) contendo 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado (Gibco, Grand Island, USA), suplementado com 10000 U/mL de penicilina G e 10000 µg/mL de ciprofloxacino, à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂.

As células foram removidas dos frascos de cultura celular com a adição de uma solução de tripsina a 0,5% em solução salina. Os frascos foram mantidos a 37°C por 5 minutos. Logo após, adicionou-se DMEM na garrafa para neutralizar a tripsina. O conteúdo de cada garrafa foi então transferido para um tubo falcon e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 10°C.

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, seguindo-se da ressuspensão das mesmas em DMEM. Após a contagem das células, estas foram diluídas em salina, resultando em uma concentração de 2×10^6 células/150 µL seguindo-se da inoculação das células nos camundongos para o desenvolvimento do tumor.

Para a indução do tumor subcutâneo maligno, 150 µL de uma solução salina contendo 2×10^6 células da linhagem A431 foram inoculados por injeção subcutânea na região dorsal de camundongos fêmeas da linhagem nude BALB/c imunodeficientes (idade 12-16 semanas, peso 18-20 g). Os camundongos foram manipulados sob fluxo laminar usando procedimentos assépticos.

4.10.3.Tratamento tópico do carcinoma de células escamosas com DOX após pré-tratamento com LFU/nanogel

A redução do volume do tumor induzido no dorso dos camundongos nude BALB/c imunodeficientes foi avaliada em 20 animais divididos em 4 grupos com 5 animais cada, sendo eles: (i) grupo controle, o qual não foi submetido a qualquer tipo de tratamento; (ii) grupo que recebeu apenas a aplicação tópica da DOX dissolvida em gel de Poloxamer a 20% (grupo passivo); (iii) grupo que recebeu o pré-tratamento do tumor com LFU/nanogel a uma distância de 5 mm da superfície do tumor, seguido da aplicação tópica da DOX dissolvida em gel de Poloxamer a 20% (grupo LFU 5 mm) e (iv) grupo que recebeu o pré-tratamento da pele com LFU/nanogel a uma distância de 10 mm da superfície do tumor, seguido da aplicação tópica da DOX dissolvida em gel de Poloxamer a 20% (grupo LFU 10 mm). Nos grupos LFU, o pré-tratamento da pele com LFU/nanogel foi realizado a cada 3-4 dias, por 15 dias (5 aplicações). A aplicação tópica do gel contendo DOX foi realizada todos os dias por 15 dias. O crescimento tumoral foi avaliado por 21 dias.

O tratamento foi iniciado após o tumor sólido alcançar um tamanho de aproximadamente 150 mm^3 ou 6-8 mm de diâmetro, o que ocorreu em aproximadamente 10 dias após a inoculação do tumor.

Para o tratamento, os camundongos foram anestesiados utilizando solução estéril de cloridrato de cetamina (Ketamina Agener 10%), xilazina (DOPASER 20 mg/mL) e soro fisiológico (1:2:7). Uma câmara plástica (seringa de 10 mL cortada) com $2,54 \text{ cm}^2$ de área, foi então aderida à superfície da pele, circundando o tumor, usando graxa de silicone. A câmara foi então preenchida com o meio de acoplamento (nanogel). O pré-tratamento da pele foi realizado com LFU por 20 s ou, em alguns casos em que o aparecimento de qualquer lesão era notada, por menos de 20 s, utilizando-se as seguintes condições experimentais: intensidade $9,6 \pm 0,5 \text{ W/cm}^2$, ciclo de trabalho 5 s ON, 5 s OFF, distância da sonda do US da superfície da pele de 5 mm ou 10 mm e troca do meio de acoplamento a cada ciclo de trabalho de 5 s. Após o pré-tratamento da pele e diariamente, foram aplicados aproximadamente 300 μL do gel contendo 120 μg de DOX no tumor. Após cada aplicação, os animais foram mantidos nas caixas estéreis até a próxima aplicação do gel contendo DOX.

Os tumores foram fotografados (Panasonic Lumix 16 mega pixels, modo automático) e seus tamanhos foram medidos usando um paquímetro antes de cada pré-tratamento da pele com LFU/nanogel, ou a cada 3-4 dias nos grupos controle e passivo. O volume do tumor foi calculado segundo a seguinte fórmula (Molavi, 2008) (Equação X):

Equação X

$$V = 0.5 \times \text{diâmetro maior} \times \text{diâmetro menor}^2$$

Após 21 dias (6 dias após a última aplicação da formulação), o sangue foi retirado por punção cardíaca para avaliar a distribuição sistêmica da DOX.

4.11. Análise estatística

Os estudos *in vitro* foram analisados de acordo com o método de análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, com $p < 0,05$ como nível mínimo de significância. Os estudos *in vivo* foram analisados usando teste t não pareado com $p < 0,05$ como nível mínimo de significância.

5. Resultados e Discussão

5.1. Obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas

A Figura 25 mostra o diagrama de fases pseudo-ternário construído para definir as áreas onde microemulsões, necessárias para a obtenção das NLS, poderiam ser encontradas. A região marcada com um tracejado contínuo indica que houve formação de microemulsão, com formulações apresentando aspecto macroscópico translúcido, de baixa viscosidade e isotrópicos quando observadas no microscópico ótico de luz polarizada. Regiões apresentando mesofases líquido-cristalinas também foram observadas quando concentrações de água acima de 50% foram utilizadas (área delimitada por tracejado pontilhado).

Figura 25: Diagrama pseudo-ternário do sistema ácido esteárico/CTAB/monoleína/água. corresponde a área de microemulsão, corresponde a área onde mesofases líquido-cristalinas foram observadas.

A monoleína, presente na composição das formulações, é um lipídeo complexo que pode formar várias estruturas na presença de diferentes concentrações de água (Kulkarni et al., 2011). Sendo assim, as mesofases cristalinas observadas no diagrama são resultantes da sua presença no sistema.

A Tabela 1 mostra as características físico-químicas das NLS obtidas a partir das microemulsões compostas por 40/20/40, 50/20/30 e 60/20/20 de ácido esteárico, CTAB/monoleína (2:1) e água, respectivamente (pontos 25, 26 e 27 do diagrama de fases apresentado na Figura 25).

Tabela 1: Características físico-químicas das Nanopartículas Lipídicas Sólidas.

Microemulsão*	% Componentes microemulsão (ácido esteárico/CTAB:monoleína (2:1)/água	Tamanho de Partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
25	40/20/40	176,8 ± 10,4	0,27 ± 0,04	+ 67,8 ± 0,0
26	50/20/30	178,2 ± 7,2	0,24 ± 0,03	+ 71,1 ± 5,9
27	60/20/20	228,3 ± 123,6	0,32 ± 0,17	+ 68,5 ± 2,3

* Pontos retirados do diagrama de fases apresentado na Figura 25. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey) entre as amostras.

A Tabela 1 mostra que as NLS apresentaram tamanho nanométrico em torno de 200 nm, com PdI entre 0,24 - 0,32 e potencial zeta positivo. O potencial zeta positivo resulta provavelmente da presença do tensoativo catiônico utilizado (CTAB). O alto potencial zeta contribui para a estabilidade das NLS, que apresentaram uniformidade na distribuição do tamanho, com PdI $< 0,3$ na maioria das dispersões e considerado adequado para NLS (Mehnert; Mader, 2001, Burra et al., 2013). Quanto ao tamanho das partículas, pode-se observar uma tendência no seu aumento quando a porcentagem de ácido esteárico foi aumentada nas microemulsões. Esta tendência é corroborada por vários estudos que relatam que o aumento no conteúdo lipídico resulta em um aumento no tamanho das partículas assim como em uma distribuição mais ampla do tamanho das mesmas (Mehert; Mader, 2001; Bottaglia et al., 2007). Esse aumento no tamanho das partículas pode estar relacionado à diminuição da eficiência emulsificante dos tensoativos com conseqüente aglomeração das partículas (Subedi; Kang; Choi, 2009), uma vez que a quantidade de tensoativo não aumentou conforme o aumento do conteúdo lipídico das formulações.

Como não houve diferença significativa ($p > 0,05$, ANOVA) no tamanho de partícula, potencial zeta e PdI das NLS obtidas a partir das microemulsões estudadas (Tabela 1), para os estudos subsequentes de composição de tensoativos escolheu-se como ponto de partida a microemulsão que apresentou menor viscosidade (40/20/40 de ácido esteárico/CTAB:monoleína (2:1)/água, ponto 25). A menor viscosidade resultou em maior facilidade na obtenção das NLS e, conseqüentemente, na menor perda de lipídeos por solidificação durante o processo de obtenção.

5.2. Efeito da proporção de CTAB:monoleína nas características físico-químicas das NLS

A Tabela 2 mostra a influência da proporção entre CTAB e monoleína nas características físico químicas das NLS obtidas a partir da mistura ácido esteárico/CTAB:monoleína/água (40/20/40).

Tabela 2: Influência da proporção CTAB:monoleína nas características físico-químicas das NLS obtidas a partir da mistura ácido esteárico/CTAB:monoleína/água (40/20/40).

Razão entre os tensoativos (CTAB:monoleína)	Tamanho de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	PdI
2:1	176,80 ± 10,40	+ 67,80 ± 0,00	0,270 ± 0,040
1:1	351,45 ± 5,16**	+ 63,52 ± 8,64	0,565 ± 0,040
1:0	343,10 ± 56,70**	+ 65,93 ± 5,27	0,540 ± 0,200
0:1*	-	-	-
1:2	182,7 ± 22,8	+ 60,60 ± 7,90	0,290 ± 0,070

* Não houve formação de NLS. ** diferença significativa em relação à formulação CTAB:monoleína 2:1 (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

O tamanho das partículas e a estabilidade física de sistemas nanodispersos podem ser influenciados por vários fatores, entre eles, o tipo e a concentração dos tensoativos (Kovacevic et al., 2011). Pode-se observar na Tabela 2 que a monoleína sozinha não foi capaz de formar NLS, uma vez que apenas este lipídeo não foi capaz de emulsionar o ácido esteárico. Por outro lado, foi possível obter microemulsão do ácido esteárico contendo apenas CTAB como tensoativo, mas a dispersão obtida foi instável, resultando em partículas com elevado tamanho e polidispersas, assim como quando a mistura 1:1 de CTAB:monoleína foi utilizada. A não formação de NLS ou formação de partículas grandes e heterogêneas pode ser atribuída ao equilíbrio hidrofílico-lipofílico que é requerido para estabilizar a fase oleosa da matriz lipídica. Quando a monoleína e o CTAB foram utilizados separadamente ou na proporção de 1:1, as concentrações utilizadas não foram suficientes para emulsificar adequadamente o ácido esteárico, ao contrário do que ocorreu quando proporções adequadas de CTAB/monoleína foram utilizadas. A proporção CTAB/monoleína 2:1 é aquela requerida teoricamente pelo ácido esteárico para sua emulsificação (ver equação I e valores de EHL no

item 4.2.2.1). De fato, a obtenção de microemulsão com esta mistura levou a obtenção de NLS de baixo tamanho médio e PdI. No entanto, a proporção CTAB/monoleína 1:2 também levou à formação de NLS com características semelhantes às nanopartículas compostas pela razão 2:1, diferindo apenas no aspecto macroscópico da microemulsão. Aquela composta por CTAB/monoleína 1:2 apresentou maior facilidade de formação, uma vez que a maior quantidade de monoleína parece ter auxiliado na melhor dispersão dos componentes da formulação. Além disso, a adição de maiores concentrações de monoleína na formulação pode ter levado a uma diminuição do ponto de fusão da microemulsão, o que levou a uma maior facilidade de gotejamento da microemulsão na água gelada durante o preparo da NLS, resultando em menor perda durante o processo. Embora o EHL requerido pelo ácido esteárico pareça não ter sido respeitado neste caso, a propriedade que a monoleína apresenta de formar mesofases cristalinas em determinadas concentrações de monoleína e água pode ter auxiliado na obtenção de NLS mais estáveis (Chen et al., 2010), garantindo a formação de partículas pequenas com baixa polidispersividade. Sabe-se que a monoleína pode absorver água e formar diferentes fases cristalinas, sendo essas fases dependentes da concentração de monoleína, água e da temperatura, de modo que, a temperatura ambiente, relata-se a formação de fases cúbicas ao passo que fases hexagonais são formadas a altas temperaturas sendo que, ambas mesofases cristalinas são capazes de sustentar a liberação de fármacos (Lopes et al., 2006). Desta forma, a maior concentração de monoleína nas NLS mostra-se interessante, uma vez que a monoleína pode se organizar na forma de uma mesofase cristalina, modificando assim o perfil de liberação do fármaco que virá a ser encapsulado nas NLS.

A variação da composição dos tensoativos não teve efeito no potencial zeta das formulações ($p > 0.05$), de modo que não houve variação no residual de carga das partículas. Esse resultado sugere um excesso de tensoativo catiônico na dispersão de NLS, mesmo quando este é utilizado na proporção 1:2 (CTAB:monoleína).

Desta forma, a razão de tensoativos 1:2 foi utilizada nos experimentos seguintes.

5.3 Obtenção e caracterização das Nanopartículas Lipídicas Sólidas com Doxorrubicina

A influência da porcentagem de DOX adicionada nas microemulsões no tamanho médio, PdI e potencial zeta das NLS obtidas a partir da mistura ácido esteárico/CTAB:monoleína (1:2)/água (40/20/40) pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3: Características físico-químicas das NLS compostas por ácido esteárico/CTAB:monoleína (1:2)/água (40/20/40) obtidas com diferentes concentrações de DOX.

Concentração de DOX (%p/p)*	Tamanho de partícula (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
0	182,7 ($\pm$ 22,8)	0,29 ($\pm$ 0,07)	+ 60,6 ($\pm$ 7,9)
1	182,3 ($\pm$ 5,2)	0,37 ($\pm$ 0,04)	+ 64,2 ($\pm$ 0,8)
2	186,7 ($\pm$ 5,5)	0,31 ($\pm$ 0,06)	+ 63,9 ($\pm$ 2,6)
3	190,4 ($\pm$ 13,1)	0,32 ($\pm$ 0,04)	+ 61,9 ($\pm$ 8,1)
4	184,9 ($\pm$ 14,8)	0,30 ($\pm$ 0,10)	+ 62,1 ($\pm$ 0,6)

* Em relação ao peso da fase lipídica (ácido esteárico).

A etapa de homogeneização a alta pressão das dispersões de NLS final resultou em uma redução no PdI para aproximadamente 0,21, sem alterações de tamanho e potencial zeta.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$, ANOVA) no tamanho das NLS com o aumento da porcentagem de DOX adicionada na microemulsão (Tabela 3). O aumento na quantidade de DOX disponível no sistema, de 1% para 4%, encapsulada ou não, pode favorecer a penetração cutânea do fármaco devido ao aumento do gradiente de concentração. A incorporação de DOX nas partículas também não alterou significativamente o potencial zeta ($p > 0,05$) da dispersão. A DOX apresenta $pK_a = 8,3$ (Subedi et al., 2009) e encontra-se dissociada na forma de cátions quando dispersa em meio aquoso. Desta forma, como a sua adição à formulação não alterou o potencial zeta da NLS sugere-se que a maior parte da DOX encontra-se dispersa na matriz lipídica (Chen et al., 2010).

O pH da dispersão de NLS, tanto na presença como na ausência da DOX, foi de aproximadamente 3. Como não existem ácidos fortes na composição das NLS, o baixo valor de pH da dispersão pode ser um indicativo da dissociação dos componentes das NLS nas condições em que estas foram obtidas, a qual poderia resultar em interações com a DOX. Desta forma, misturas binárias e ternárias de DOX com os componentes da formulação foram preparadas para verificar se a redução do pH resultava em modificações no perfil cromatográfico da DOX.

Entre as misturas testadas, apenas a mistura composta por DOX, ácido esteárico e CTAB (mistura IV), a mistura física da DOX com a NLS (mistura VII) e a NLS-DOX resultaram em dispersões com pH de aproximadamente 3. As outras misturas apresentaram

pH que variou de aproximadamente 5 a 5,5. O perfil cromatográfico da DOX nas misturas dissolvidas em metanol pode ser observado na Figura 26.

Figura 26: Cromatogramas das combinações da DOX com os componentes das NLS: A) DOX + CTAB, B) DOX + ácido esteárico, C) DOX + monoleína, D) DOX + CTAB + ácido esteárico, E) DOX + CTAB + monoleína, F) DOX + ácido esteárico + monoleína, G) NLS + DOX (mistura física), H) NLS-DOX e I) NLS branca.

Pode-se observar na Figura 26 que a NLS-DOX (cromatograma H) e a mistura DOX + CTAB + ácido esteárico (cromatograma D) foram as únicas a apresentar um segundo pico no cromatograma no tempo de retenção de 7,4 min, além do pico característico de DOX em 3,4 min. Sugere-se que nas condições que as dispersões foram obtidas, o CTAB promovia a dissociação do ácido esteárico, resultando na formação de um par iônico entre este lipídeo e a DOX (pKa 8,3, catiônica em pH 3). A formação de pares iônicos entre compostos aniônicos e DOX já foi relatada por (Trotta; Gasco, Carlotti, 1988, Cavalli; Caputo; Gasco, 1993, Ma et al., 2009, Zhang et al., 2011). Essa interação leva à formação de um composto mais lipofílico, reduzindo desse modo a polaridade da DOX e resultando em um tempo mais longo para a mesma ser eluída da coluna cromatográfica apolar C18. Pode-se observar no cromatograma H da Figura 26 que parte da DOX na dispersão de NLS elui rapidamente e parte demora mais para ser eluída. Pode-se sugerir, desta forma, que a dispersão de NLS é composta por DOX livre e pelo par-iônico DOX-ácido esteárico. A eficiência de encapsulação (EE) da DOX foi então calculada com base na área do segundo pico da Figura 34 H, apresentando valor de 43,8 % e corroborando com a eficiência de encapsulação quantificada por UV-VIS que foi de $47,39 \pm 2,52$ %.

A EE pode ser definida como a porcentagem de fármaco incorporada na matriz lipídica em relação à quantidade total de fármaco adicionada à dispersão. Em outras palavras, a EE especifica quanto do fármaco é carregado pelas nanopartículas e quanto está livre na dispersão. Estudos mostram EE relativamente altas (80 a 99 %) para fármacos como tetracaína e prednisolona respectivamente, que apresentam alta solubilidade lipídica. No entanto, fármacos hidrofílicos como a DOX não particionam bem para a fase lipídica durante a preparação das NLS o que pode levar a uma baixa eficiência de encapsulação desses fármacos (Muller et al., 2000; Muchow; Maincent; Muller, 2008). A Tabela 4 mostra a EE da DOX nas NLS, determinada por UV/vis, como descrito no item 4.3.6., quando concentrações crescentes de DOX foram adicionadas à microemulsão inicial.

Tabela 4: Eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC) das NLS contendo DOX preparadas a partir de diferentes concentrações de DOX.

Concentração DOX (% p/p)	%EE	%CC
1	35,90 ± (3,40)	0,23 ± (0,05)
2	47,67 ± (1,09)	0,73 ± (0,02)
3	47,51 ± (12,85)	0,95 ± (0,35)
4	47,39 ± (2,52)	1,46 ± (0,15)

NLS caracterizadas antes da homogeneização da dispersão no homogeneizador a alta pressão

A capacidade de carga (CC) das NLS também foi calculada (Tabela 4). A CC refere-se à quantidade de fármaco incorporada na matriz lipídica em relação ao peso total de lipídeos, sendo altamente dependente da solubilidade do fármaco no lipídeo, miscibilidade do fármaco e lipídeo fundido, estrutura física e química da matriz lipídica sólida e estado polimórfico do material lipídico. Assim como a EE, fármacos hidrofílicos apresentam baixos valores de CC (Muller et al., 2000; Muchow; Maincent; Muller, 2008). Pode-se observar na Tabela 4 que, com exceção da concentração de 1,0%, as demais concentrações de DOX apresentam uma eficiência de encapsulação de aproximadamente 50%, com um leve aumento da capacidade de carga com o aumento da concentração de DOX. EE semelhante foi observada por Ruckmani et al., (2006) para o metotrexato (%EE=51,52%), um agente anticâncer também hidrofílico, em NLS. Por outro lado, Taveira et al. (2014) obtiveram uma EE de 90% para a DOX em NLS de mesma composição que Ruckmani et al (2006) (ácido esteárico, lecitina e taurodeoxicolato de sódio). A alta EE da DOX nas NLS de Taveira et al (2014) comparada com a EE obtida neste trabalho pode ser explicada em termos de solubilidade da DOX no lipídeo fundido e no pH da dispersão. Taveira et al. (2014) obteve dispersões de NLS com pH em torno de 5,5. De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch (equação XI), neste pH a razão entre a DOX ionizada e não ionizada ($[BH^+]/[B]$) é de 631, ao passo que para a DOX no pH das dispersões deste trabalho é de 502000, ou seja, quase 800 vezes mais moléculas de DOX ionizada estão presentes na dispersão de NLS-DOX contendo ácido esteárico/CTAB:monoleína/água do que na NLS-DOX contendo ácido esteárico/lecitina:taurodeoxicolato/água. Desta forma, apesar da queda do pH ter facilitado a formação de par iônico da DOX com o ácido esteárico, como sugerido anteriormente, o grande número de moléculas ionizadas pode ter sofrido também repulsão pelo tensoativo catiônico CTAB, diminuindo o número de moléculas capazes de interagir com o lipídeo.

Equação XI

$$pKa = pH + \log \frac{[BH^+]}{[B]}$$

Desta forma, sugere-se que a eficiência de encapsulação da DOX pode também ser aumentada em função do pH da dispersão de NLS. Mais especificamente, uma vez que a DOX possui $pK_a=8,3$, esta pode se encontrar em maior concentração na forma não ionizada em valores de pH mais elevados, diminuindo sua hidrofiliicidade e facilitando assim sua interação com a matriz lipídica das NLS. Optou-se, no entanto, por trabalhar com a formulação contendo CTAB porque pretende-se aumentar a interação do nanocarreador positivamente carregado com a pele, a qual é uma membrana negativamente carregada. As NLS obtidas usando lecitina e taurodeoxicolato como tensoativos apresentaram potencial zeta negativo de -30 mV (Taveira et al., 2014).

A capacidade de carga é um parâmetro relevante para predizer se o sistema de liberação é adequado para determinado fármaco. Neste estudo, foram obtidos valores de capacidade de carga de até 1,46% (p/p). Tais valores, tanto de EE% quanto de CC% mostraram-se adequados para a proposta deste trabalho uma vez que a concentração aproximada de DOX em sistemas de encapsulação para tratamento de câncer de pele (linhagem celular B16F10) relatada foi de 3 mg/Kg (Talelli et al., 2010). Desta forma, seriam necessários apenas 100 µL da dispersão de NLS contendo DOX obtida para atingir a concentração necessária para o tratamento de tumores cutâneos.

Portanto, nos estágios seguintes deste estudo, as NLS-DOX foram obtidas a partir de microemulsões contendo 4% de DOX, uma vez que as NLS apresentaram tamanho, PDI e potencial zeta adequados. Além disso, o aumento da concentração de DOX para 8 % levou a precipitação do fármaco no momento de formação da microemulsão.

Com o objetivo de diminuir a alta polidispersão apresentada pela dispersão aquosa de NLS-DOX, após a etapa de homogeneização no Ultraturrax, a dispersão aquosa de NLS foi levada ao homogeneizador de alta pressão, resultando nas NLS com as características desejadas (tamanho de partículas 184, 9 nm) (Tabela 3) e que foram utilizadas nos estudos subsequentes. A homogeneização a alta pressão atua diminuindo a polidispersão das NLS, e não interfere na EE % da DOX nas NLS (Tabela 4).

Para comprovar a provável associação da DOX com o ácido esteárico presente nas NLS quando CTAB:monoleína foram usados como tensoativos foi realizado um experimento

simple de partilha para verificar a distribuição da DOX e da NLS-DOX em meio polar e apolar (Figura 27).

Figura 27: Coeficiente de partição da DOX a partir de NLS-DOX e da solução de DOX, utilizando clorofórmio e acetato de etila como fase apolar e água como fase polar. A DOX apresenta coloração vermelha em solução. Nenhum dos componentes da NLS apresenta coloração, exceto a DOX.

Pode-se observar na Figura 27 que a NLS-DOX apresenta coloração vermelha na fase polar e apolar, sugerindo a partilha da DOX para ambas as fases, enquanto a DOX em solução partilha-se apenas para a fase aquosa. Cavalli; Caputo e Gasco (1993) também mostraram o aumento da lipofilicidade da DOX como resultado da formação de pares iônicos com ésteres de fosfato.

A Figura 28 mostra a morfologia das NLS-DOX obtidas por MFA. A microscopia de força atômica tem sido empregada recentemente como a maior ferramenta para a observação do tamanho e morfologia de NLS devido às vantagens que essa técnica oferece como detecção e caracterização de populações heterogêneas, a utilização de pequena quantidade de material e a quantidade de informação que pode ser adquirida a partir das análises por MFA (Seetapan et al., 2010).

Figura 28: Morfologia das NLS observada por microscopia de força atômica (A) topografia e (B) imagem de fases. As setas indicam as NLS-DOX.

Pode-se observar na Figura 28 que as NLS apresentaram forma esférica e tamanho médio de 70 nm, diferindo dos estudos de PCS que mostraram NLS com tamanho médio de 184,9 nm. Sugere-se que a diferença entre o tamanho médio das NLS obtido pelas duas técnicas possa ser devido a presença da monoleína. Mais especificamente, nos estudos por PCS, as NLS estavam dispersas em água. Como a monoleína pode absorver água formando mesofases cristalinas (Lopes et al., 2006), isso pode resultar em um maior raio hidrodinâmico. Por outro lado nos estudos de MFA, as NLS não encontravam-se hidratadas, o que provavelmente resultou no menor tamanho de partículas.

5.4. Obtenção de hidrogel enriquecido com a dispersão aquosa de NLS-DOX (nanogel NLS-DOX)

A dispersão de NLS possui tipicamente baixa viscosidade, o que pode dificultar a aplicação tópica da formulação além de resultar em um curto tempo de retenção do fármaco na pele. Para facilitar a aplicação tópica das NLS e aumentar seu tempo de contato com a pele, tem sido proposto incorporar as dispersão de NLS em veículos semi-sólidos como, por exemplo, nos hidrogéis. Os hidrogéis são constituídos por polímeros hidrofílicos adequados a aplicação tópica (Shah et al., 2012; Silva et al., 2012). Além disso, a incorporação das NLS no hidrogel pode permitir o ajuste do pH da formulação final.

O poloxamer é um polímero hidrofílico termossensível que tem sido extensamente utilizado como agente formador de gel *in situ* na temperatura corporal. Este polímero é capaz

de formar micelas em solução que se auto-organizam e formam um gel viscoso dependendo da concentração do polímero e da temperatura. O gel de poloxamer pode ser facilmente administrado, uma vez que apresenta baixa viscosidade a baixas temperaturas, o que facilita a aplicação do gel na pele. Mas uma vez em contato com a pele as micelas se autoorganizam e o sistema adquire viscosidade, mantendo a formulação no local da aplicação (Gratieri et al., 2010). Além disso, as micelas presentes no gel podem estabilizar as NLS evitando que se agreguem.

No presente estudo, vários métodos foram testados para a obtenção do nanogel NLS-DOX, como a incorporação do Poloxamer 407 na dispersão de NLS (Shah et al., 2012) e a adição de NLS-DOX liofilizadas no hidrogel. Porém, esses métodos resultaram em aumento do tamanho de partícula e PdI das NLS-DOX (246 nm e 0,506 de PdI para a incorporação do poloxamer na dispersão e 1486 nm e 0,814 de PdI para a adição de NLS liofilizadas no hidrogel). No entanto, quando a dispersão aquosa de NLS foi incorporada no hidrogel, o gel resultante apresentou pequeno aumento no tamanho de partícula e diminuição do PdI (Tabela 5).

Tabela 5: Características físico-químicas da dispersão de NLS-DOX e do nanogel NLS-DOX.

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	pH
Nanogel sem fármaco	13,42(±2,55)	0,33(±0,12)	5,70(±2,14)	6,81(±0,20)
NLS-DOX	136,10(±17,25)	0,29(±0,02)	56,1(±0,42)	3,12 (±0,51)
NLS-DOX no nanogel	196,75(±40,37)	0,20(±0,04)	15,1(±3,81)	4,71(±0,22)

O perfil de distribuição do tamanho das NLS dispersas no gel obtido por PCS pode ser observado na Figura 29.

Figura 29: Perfil de distribuição do tamanho das NLS obtido por PCS. A) NLS-DOX em água, B) nanogel NLS-DOX e C) gel de poloxamer sem NLS.

Pode ser observado na Figura 29 a diminuição da largura da base do pico de distribuição das NLS-DOX dispersas no nanogel NLS-DOX (Figura 29 B) em relação ao pico das NLS-DOX em solução (Figura 29 A), sugerindo a estabilização das partículas pelas micelas do nanogel.

Deste modo, como o menor tamanho de partícula juntamente com uma viscosidade adequada é desejado para uma aplicação tópica, o hidrogel foi preparado incorporando a dispersão aquosa de NLS no polímero concentrado recém disperso em água. O nanogel NLS-DOX apresentou-se líquido em temperatura inferior a 23°C, mas na forma de um gel viscoso acima desta temperatura.

Vários autores têm estudado a incorporação de nanopartículas em hidrogéis (Jain et al., 2014, Shah et al., 2012). Shah et al., (2012) não observaram variação no tamanho de partículas poliméricas quando incorporadas em hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose a baixas concentrações de polímero, mas um aumento na concentração do polímero levou ao aumento do tamanho de partícula e PDI. Souto et al. (2004) avaliaram a estabilidade física de NLS e CLN antes e depois da incorporação em diferentes hidrogéis. Eles observaram uma distribuição monomodal antes e após a incorporação dos nanocarreadores nos hidrogéis.

Assim como nos trabalhos citados acima, o nanogel contendo as NLS-DOX também apresentou distribuição monomodal (Figura 29B). Porém, houve uma diminuição no valor de potencial zeta que pode estar relacionado com a mudança de pH do sistema. Possivelmente, quando as NLS foram incorporadas no gel de poloxamer, a distribuição dos contra-íons da dispersão foi alterada, modificando a diferença de potencial entre as partículas e o pH da formulação final. Apesar destas variações, as micelas do gel de poloxamer foram capazes de manter as NLS estáveis e ainda catiônicas.

5.4.1 Estudos de microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura das NLS dispersas em água mostrou um agregado de nanopartículas com tamanho médio de 400 nm (Figura 30 A), não corroborando com os dados obtidos por PCS (185 nm aproximadamente, Tabela 5). Isso se deve provavelmente ao aquecimento da amostra durante o processo de captação das imagens, que pode levar a modificações estruturais das nanopartículas (Silva et al., 2012). Por outro lado, as micrografias do nanogel mostraram uma estrutura contínua e compacta (Figura 30 B), não sendo possível visualizar a rede polimérica formada pelo gel. No entanto, foi possível visualizar nanopartículas de aproximadamente 200 nm bem como aglomerados de 400 nm na rede polimérica do nanogel quando NLS-DOX foram dispersas neste meio (Figura 30 C).

A)

B)

C)

Figura 30: Imagens de microscopia eletrônica de varredura: A) NLS-DOX, B) nanogel e C) nanogel NLS-DOX. As setas indicam as nanopartículas presentes na matriz do gel.

Tal resultado nos permite concluir que a microscopia eletrônica de varredura, apesar de evidenciar a presença de nanopartículas na rede polimérica do nanogel, não é adequada para determinação da morfologia de tais sistemas nas condições em que foi empregada.

5.4.2. Análise por microscopia de luz polarizada

Cristais líquidos podem ser definidos como um estado da matéria com propriedades entre um sólido ordenado e um líquido isotrópico, podendo apresentar similaridade estrutural aos sólidos cristalinos bem como alguma desordem, evidenciada pela facilidade de fluxo, como encontrada em líquidos (Singh, 2000). O poloxamer é um tensoativo não-iônico composto por blocos hidrofílicos de poli-(óxido de etileno) (POE) e hidrofóbicos de poli-(óxido de propileno) (POP), em cadeias na forma de tribloco (OE-OP-OE) com propriedades de geleificação termorreversível (Wei et al., 2002). Tem sido bem estabelecido que o poloxamer se auto-organiza na presença de determinados solventes em uma variedade de fases líquido-cristalinas liotrópicas com morfologia micelar, hexagonal ou cúbica (micelar ou reversa) (Alexandridis et al., 1996, Holmqvist et al., 1997, Svensson et al., 1998). É por isso que vem sendo chamados de nanogel (Choi et al., 2010). Em concentrações mais elevadas e temperaturas intermediárias as micelas se organizam em uma rede e cristalizam, formando um gel claro e visoso (Choi et al., 2010).

Em adição às características de cristais-líquido das dispersões de Poloxamer, a monoleína, lipídeo polar utilizado na composição das NLS-DOX, pode formar várias mesofases cristalinas em contato com água, sendo elas: lamelar, bicontínua reversa e cúbica, a

temperatura ambiente, e hexagonal reversa, a temperaturas elevadas. Diversas vantagens têm sido associadas ao uso farmacêutico das mesofases cristalinas como aumento da estabilidade química, liberação controlada e aumento da penetração de fármacos na pele (Nakano et al., 2002, Lopes et al., 2006). Desta forma, o nanogel contendo as NLS-DOX pode aliar as vantagens das fases líquido-cristalinas formadas tanto pelo Poloxamer como pela monoleína.

O nanogel de poloxamer a 20% apresentou viscosidade aparente de 11,032 Pas a taxa de cisalhamento de 10,35 [1/s] a 25°C e aspecto isotrópico (Figura 31 A), característico de fase cristalina cúbica. Já as NLS-DOX apresentaram traços de birrefringência (Figura 31 B). Quando as NLS-DOX foram incorporadas no nanogel de poloxamer (nanogel NLS-DOX), o sistema também apresentou aspectos de birrefringência (Figura 31 C e D), provavelmente devido à presença das NLS-DOX no nanogel.

Figura 31: Microscopia de luz polarizada das formulações: A) Nanogel de poloxamer 407 20% (p/v), B) NLS-DOX, C) Nanogel NLS-DOX a 25°C (aumento de 10x) e D) Nanogel NLS-DOX a 25°C aumento de 32x.

No entanto, as fases cristalinas foram precisamente caracterizadas após estudos de difração de raios X a baixo ângulo, como descrito a seguir.

5.4.3. Estudos de difração de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A difração de raios X a baixo ângulo (SAXS) tem sido uma técnica bastante empregada para investigar aspectos estruturais e interações em nanoescala. Uma vez que a formação e o tipo de fase cristalina formada influenciam diretamente perfil de liberação (Lara, Bentley; 2005, Esposito, 2003), estabilização (Boyd 2006), solubilização (Lara; Bentley, 2005, Esposito 2003, Lopes et al., 2006) e penetração de fármacos na pele (Lopes et al., 2006, Lopes et al., 2007), estudos para determinar a estrutura de fases cristalinas em sistemas nanoparticulados são importantes para melhor entendimento do seu comportamento.

Cristais líquidos podem acomodar fármacos na sua estrutura interna, o que pode levar a quebra ou modificação da fase líquido-cristalina (Singh, 2000). Desta forma, as formulações desenvolvidas neste trabalho foram avaliadas na presença e na ausência da DOX.

A Figura 32 mostra o difratograma e a Tabela 6 mostra os dados obtidos a partir do experimento de SAXS bem como a estrutura cristalina das formulações contendo NLS e NLS-DOX.

Figura 32: Difratograma obtido a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS) das NLS e NLS-DOX.

Tabela 6: Dados obtidos a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS): vetor de espalhamento (q), distância interplanar (d), razão entre a distância interplanar de dois picos, parâmetro de rede (a) e estrutura cristalina das formulações NLS e NLS-DOX.

Dados obtidos do SAXs	Formulação		
	NLS		NLS-DOX
Pico	1	2	1
q (nm^{-1})	1,56	3,11	1,56
d (nm)	4,02	2,02	4,02
Razão	1:1	1:1/2	1:1
a (nm)	4,02	4,04	4,02
Estrutura	Lamelar	Lamelar	Lamelar

Pode-se observar na Tabela 6 que a incorporação da DOX nas NLS não alterou a estrutura líquido-cristalina da nanopartícula, que continuou a apresentar $d = 4,02$. Em adição, os dados obtidos pelo estudo de difração de raios X evidenciaram a presença de fase líquido-cristalina lamelar na dispersão das NLS compostas por monoleína (0,62 % p/v), ácido esteárico (1,90 % p/v), CTAB (0,33 % p/v) e água. Fases líquido-cristalinas lamelares são particularmente adequadas para aplicação dérmica devido a maior similaridade com as membranas lipídicas intercelulares (Gosenca et al., 2013).

Por outro lado, pode-se observar que o nanogel de poloxamer 20,0% apresenta estrutura líquido-cristalina cúbica (Figura 33, Tabela 7).

Figura 33: Difratoograma obtido a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS) do nanogel e nanogel-NLS.

Tabela 7: Dados obtidos a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS): vetor de espalhamento (q), distância interplanar (d), razão entre a distância interplanar de dois picos, parâmetro de rede (a) e estrutura cristalina das formulações nanogel e nanogel-NLS.

Dados obtidos do SAXs	Formulação				
	Nanogel		Nanogel NLS		
Pico	1	2	1	2	3
q (nm ⁻¹)	0,31	0,63	0,27	0,55	1,56
d (nm)	20,08	10,00	23,25	11,42	4,02
Razão	1:1	1:√4	1:1	1:√4	1:1
a (nm)	20,08	20,00	23,25	22,85	4,02
Estrutura	Cúbica	Cúbica	Cúbica	Cúbica	Lamelar

A utilização de géis com fase líquido cristalina cúbica é de grande interesse na área farmacêutica, uma vez que permite a incorporação e a liberação sustentada de fármacos com diferentes pesos moleculares e solubilidade em água (Shah et al., 2001). Em adição, a fase cristalina lamelar da nanopartícula continua presente na presença do nanogel (Figura 33).

No entanto, pode-se observar na Figura 34, Tabela 8 que a adição de DOX às NLS diminui as distâncias interplanares (d) do nanogel quando comparada a adição de apenas NLS ao nanogel.

Figura 34: Difratoograma obtido a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS) do nanogel-NLS e nanogel-NLS-DOX.

Tabela 8: Dados obtidos a partir da difração de raios X a baixo ângulo (SAXS): vetor de espalhamento (q), distância interplanar (d), razão entre a distância interplanar de dois picos, parâmetro de rede (a) e estrutura cristalina das formulações nanogel-NLS e nanogel NLS-DOX.

Dados obtidos do SAXs	Formulação					
	Nanogel-NLS			Nanogel NLS-DOX		
Pico	1	2	3	1	2	3
$q \text{ (nm}^{-1}\text{)}$	0,27	0,54	1,56	0,31	0,63	1,56
$d \text{ (nm)}$	23,25	11,42	4,02	20,08	10,04	4,02
Razão	1:1	1: $\sqrt{4}$	1:1	1:1	1: $\sqrt{4}$	1:1
$a \text{ (nm)}$	23,25	28,85	4,02	20,08	20,08	4,02
Estrutura	Cúbica	Cúbica	Lamelar	Cúbica	Cúbica	Lamelar

O parâmetro de rede (a) fornece informações úteis sobre a estrutura interna da fase cristalina, como, por exemplo, a distância entre o núcleo das micelas ordenadas do gel (Amar Yuli et al., 2007). A polaridade e a estrutura molecular determina aonde o fármaco ou outras substâncias vão se localizar na estrutura líquido-cristalina. O aumento de (a) quando NLS são adicionadas ao gel sugere que as NLS estejam localizadas internamente na estrutura cristalina (Libster et al., 2009). Por outro lado, na NLS-DOX há a presença da DOX encapsulada na NLS (~50%) e da DOX livre no meio. A diminuição em (a) quando a NLS-DOX é adicionada ao gel sugere um efeito de desidratação, ou seja, a DOX livre presente na fase aquosa pode competir como o polímero pelas interações com a água, levando a destruição do cristal e consequentemente diminuição de (a) (Amar-Yuli et al., 2007). Além disso, a adição da NLS-DOX ao nanogel apresenta transição de fases lamelar e cúbica no sistema de liberação (Figura 34, Tabela 8).

O nanogel NLS-DOX apresenta grande potencial como sistema de liberação tópico de fármacos uma vez que as fases líquido-cristalinas presentes no sistema favorecem uma liberação sustentada. Em adição, um aumento da hidratação da pele tem sido relacionado a fases líquido-cristalinas lamelares, o que pode favorecer uma maior penetração de fármacos na pele.

5.5. Análise reológica

O comportamento reológico do nanogel e do nanogel NLS-DOX foi investigado uma vez que as propriedades de espalhabilidade e o tempo de contato da formulação na superfície da pele estão diretamente relacionados ao comportamento reológico do gel (Lee et al., 2009). Para observar os efeitos da adição de dispersão aquosa de NLS-DOX nas propriedades do nanogel, análises reológicas comparativas foram feitas para o nanogel de poloxamer e para o nanogel SLN-DOX a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ($T_{\text{sol/gel}}$ do nanogel = $23,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$). A Figura 35 mostra o gráfico obtido quando a velocidade de cisalhamento é plotada em função da tensão de cisalhamento 24 horas após o preparo das formulações.

Figura 35: Velocidade de cisalhamento [1/s] versus tensão de cisalhamento [Pa] obtidos 24 horas após o preparo das formulações: A) nanogel e B) nanogel NLS-DOX.

Pode-se observar que, tanto para o nanogel (Figura 35 A), quanto para o nanogel NLS-DOX (Figura 35 B), a tensão de cisalhamento não foi proporcional a velocidade de cisalhamento. Em ambos os reogramas, a viscosidade do gel diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento devido a um rompimento da estrutura interna do gel, de modo que as moléculas se alinharam na direção do fluxo, oferecendo menos resistência ao mesmo. Esse fato, aliado a liberação da água que estava aprisionada contribui para a diminuição da viscosidade. Então, ocorre a transformação do sistema de gel-sol para sol-gel e a concavidade característica do reograma para o eixo da taxa de cisalhamento indica que ambas as formulações apresentaram fluxo pseudoplástico, resultante da rede coloidal que se alinhou na direção do cisalhamento. Em adição, o índice de fluxo (n) caracteriza o comportamento não

newtoniano. Os índices de fluxo de 0,946 e 0,962 obtidos para o nanogel e nanogel NLS-DOX caracterizam fluxo pseudoplástico ($n < 1$).

A adição de NLS-DOX ao nanogel diminuiu a viscosidade aparente do mesmo (Figura 35). Sabe-se que o comportamento reológico de dispersões está relacionado ao tamanho de partículas. O movimento *Browniano* de pequenas partículas é maior do que o de grandes partículas. Deste modo, a taxa de cisalhamento necessária para superar o movimento *Browniano* e permitir que as partículas se alinhem em direção ao fluxo é maior para pequenas partículas, o que resulta em maior viscosidade aparente. A estrutura do nanogel é composta por partículas de aproximadamente 13 nm (Tabela 5). A adição de NLS de aproximadamente 200 nm ao nanogel causou um aumento no tamanho médio das partículas, facilitando seu alinhamento em direção ao fluxo e diminuindo a viscosidade do gel. A diminuição da viscosidade de hidrogéis em função do aumento do tamanho de partículas também foi observado por Silva et al. (2012).

5.6. Estudos *in vitro* de liberação da DOX a partir das NLS-DOX, do nanogel NLS-DOX e do nanogel-DOX

A Figura 36 apresenta o perfil de liberação da DOX a partir das NLS, do nanogel DOX e do nanogel NLS-DOX.

Figura 36: Quantidade de DOX liberada a partir de diferentes formulações em 26 horas.

Uma relação linear foi obtida para cada formulação quando a quantidade de fármaco liberada foi plotada em função da raiz quadrada do tempo ($r^2 > 0,98$), indicando que o modelo de Higuchi pode descrever a liberação. Esse modelo se aplica a liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e/ou sólidas,

indicando que o mecanismo que controla a liberação do fármaco é a difusão. Esta relação tem sido muito utilizada para descrever a liberação de fármacos por vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada (Jose et al., 2014). Ao fim de 26 horas de experimento, a porcentagem total de DOX liberada a partir do nanogel DOX, NLS-DOX e nanogel NLS-DOX foi de 29,38 $\pm$ 14,41, 18,36 $\pm$ 2,42 e 14,13 $\pm$ 1,09 respectivamente. A taxa de liberação da DOX obtida a partir do nanogel DOX, NLS-DOX e nanogel NLS-DOX foi de 16,56 ($\pm$ 6,50); 4,68 ($\pm$ 0,56) e 3,20 ($\pm$ 0,28) $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}^{1/2}$ respectivamente. A incorporação da DOX nas NLS sustentou, portanto, a liberação do fármaco, devido à interação da DOX com os componentes da formulação. A incorporação das NLS-DOX na matriz do gel resultou em uma liberação ainda mais sustentada da DOX devido à combinação da resistência difusional de ambos os sistemas, com uma quantidade de fármaco 1,5 vezes menor que a liberada quando a DOX encontra-se apenas encapsulada em NLS e 5 vezes menor que a quantidade de DOX liberada quando o fármaco encontra-se disperso no nanogel. A incorporação da DOX no nanogel além de modificar o mecanismo de liberação do fármaco, sustentou a liberação da mesma comparado à solução da DOX, que segue o modelo de liberação de ordem zero, com fluxo de aproximadamente 120 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$. O mesmo comportamento na liberação da risperidona foi observado por Silva et al., 2012 ao adicionar NLS contendo o fármaco em hidrogel de carbopol (Silva et al., 2012).

5.7. Pré-tratamento da pele usando ultrassom de baixa frequência - (LFU)

Fatores como intensidade, frequência, tamanho da sonda e distância entre a sonda do ultrassom e a superfície da pele tem sido extensamente estudados, mostrando efeitos significativos na melhora da permeabilidade da pele (Wolloch; Kost, 2010). No entanto, a otimização desses fatores tem uma limitação em relação a segurança do paciente.

Diversos mecanismos têm sido propostos e testados para estabelecer se eles têm um papel significativo no aumento da permeação quando o LFU é aplicado na pele. Entre esses mecanismos pode-se citar: (i) cavitação acústica (transiente e estável) que ocorre no meio de acoplamento acima da superfície da pele, (ii) efeitos térmicos e (iii) convecção. Dentre esses mecanismos, somente a cavitação transiente tem sido consistentemente identificada como mecanismo responsável pelo aumento da permeação (Polat et al., 2011b). A cavitação transiente pode perturbar a superfície da pele através de microjatos líquidos, derivados do colapso das bolhas formadas durante a aplicação do LFU, na superfície da pele levando a formação de regiões de alta permeabilidade (LTRs). Desta forma, com o objetivo de avaliar o

efeito da composição do meio de acoplamento na nucleação de bolhas e, conseqüentemente, no seu colapso e na formação e distribuição das LTRs na pele, o pré-tratamento da pele foi realizado com diferentes meios de acoplamento.

Os meios de acoplamento estudados foram uma solução composto por SLS em PBS (PBS+SLS), uma solução de CTAB em PBS (CTAB+PBS), a dispersão de NLS, o nanogel, nanogel contendo CTAB, nanogel contendo NLS e hidrogéis de quitosana, HEC e Carbopol. Esses meios foram escolhidos porque fatores como tensão interfacial e viscosidade do meio de acoplamento, presença de partículas e o tamanho das partículas podem influenciar o processo de cavitação acústica transiente. Especificamente, cada meio foi escolhido com base nas seguintes considerações:

1) PBS+SLS é o meio de acoplamento padrão utilizado nos estudos de LFU (Polat et al., 2011a, Polat et al., 2011b, Schoellhammer et al., 2012, Schoellhammer et al., 2015). Trata-se de uma solução do tensoativo aniônico em PBS na concentração de 1%.

2) PBS+CTAB foi proposto para avaliar o efeito do tensoativo catiônico na permeabilidade da pele e porque ele está presente na composição das NLS. Desta forma, pode-se avaliar seu efeito isolado e quando incorporado no sistema nanoparticulado.

3) NLS foram avaliadas como meio de acoplamento porque poderiam influenciar na formação dos microjatos que ocorrem quando o colapso da bolha de cavitação se dá próximo de superfícies sólidas. A influência de micropartículas de sílica no meio de acoplamento já foi estudada (Wholloch; Kost, 2010), mas a influência de partículas lipídicas com tamanho na faixa nanométrica (NLS) nunca foi avaliada com este intuito.

4) Nanogel foi escolhido porque a viscosidade parece ter grande influência na ocorrência da cavitação. Apesar de terem sido extensamente utilizados como meio de acoplamento para o HFU (Polat et al., 2011a), os géis nunca foram utilizados para o LFU. Isto porque tem sido sugerido que meios com alta viscosidade podem suprimir a cavitação quando se utiliza LFU, necessitando do emprego de maior energia para que ela ocorra (Tang et al., 2002). Mas, apesar da alta viscosidade aparente dos géis, eles são compostos por redes poliméricas formadas em ambientes altamente aquosos, que pode facilitar a cavitação. Ainda, acima do limiar de intensidade necessário para que a cavitação ocorra, a velocidade de dissolução dessas bolhas pode ser menor do que nos meios menos viscosos, de forma que elas poderão ainda estar presentes no próximo ciclo de trabalho do ultrassom, levando a um aumento na quantidade de bolhas e conseqüentemente na maior desorganização da pele. Desta forma o nanogel devido a sua alta viscosidade aliada ao alto conteúdo de água, além de suas características particuladas devido a presença de micelas (Tabela 5).

5) Nanogel+CTAB e Nanogel+NLS foram utilizados para verificar efeitos sinérgicos da viscosidade com o tensoativo catiônico e com a nanopartícula lipídica.

6) Géis de Carbopol (aniônico), quitosana (catiônico) e HEC (não-iônico) foram estudados para se verificar a influência do potencial zeta no processo de cavitação em meios viscosos. Neste caso, tomou-se o cuidado de preparar géis com a mesma viscosidade do nanogel para evitar a variação de outros parâmetros de estudo.

A Tabela 9 mostra o tamanho médio de partículas e PDI (quando aplicáveis) e o potencial zeta das formulações utilizadas como meio de acoplamento no pré-tratamento da pele com LFU.

Tabela 9: Caracterização físico-química dos meios de acoplamentos utilizados no pré-tratamento da pele com LFU.

Meio de acoplamento	Tamanho médio de partículas (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
PBS+SLS 1%	*	**	-13,83(±3,20)
PBS+CTAB 0,33%	*	**	3,68(±1,71)
NLS	220,86 (±39,77)	0,284(±0,025)	68,51 (±6,94)
Nanogel	13,42(±2,55)	0,33(±0,12)	5,70(±2,14)
Nanogel+CTAB 0,33%	12,77 (±8,40)	0,383(±0,10)	5,72(±4,83)
Nanogel+NLS	196,75(±40,37)	0,20(±0,04)	15,1(±3,81)
Hidrogel de quitosana	*	**	73,86(±2,17)
Hidrogel de HEC	*	**	1,12(±0,07)
Hidrogel de Carbopol	*	**	-33,1(±1,67)

*Não apresentam tamanho médio de partículas.

**Não apresentam PDI.

A viscosidade dos meios de acoplamento em cada concentração de polímero testada pode ser visualizada na Tabela 10.

Tabela 10: Viscosidade aparente dos hidrogéis com diferentes concentrações de polímero obtida à taxa de cisalhamento de 30 (1/s).

Hidrogel	Viscosidade (Pa.s)						
	Concentração do polímero (%p/v)						
	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0
Carbopol	1,345 ±	3,154 ±	4,998 ±	-	4,404 ±	-	-
	0,064	0,019	0,409		1,454		
HEC	-	-	0,702 ±	1,302 ±	2,300 ±	5,264 ±	8,270 ±
			0,010	0,069	0,062	0,099	0,289
Quitosana	-	-	0,387 ±	0,750 ±	1,134 ±	3,406 ±	-
			0,025	0,045	0,025	0,070	

* Nanogel de poloxamer 20 % (p/v): viscosidade aparente = 2,618 ± 0,420 (Pa.s) (Gratieri et al., 2010).

As concentrações de 0,25%; 1,0% e 1,5% dos polímeros de Carbopol, HEC e quitosana, respectivamente, resultaram em hidrogéis com viscosidade semelhante ao nanogel de poloxamer a 20% (Tabela 10). Desta forma, géis de cada polímero preparados nessas concentrações foram utilizados como meio de acoplamento nos estudos com o LFU.

Na Figura 37 tem-se os reogramas dos hidrogéis. Pode-se observar que todos eles apresentaram fluxo pseudoplástico, o que é caracterizado por uma tensão de cisalhamento não proporcional a taxa de cisalhamento, resultando na diminuição da viscosidade do gel com o aumento da taxa de cisalhamento. Os hidrogéis apresentaram índice de fluxo (n) de 0,997; 0,997; 0,997 e 0,946 para o Carbopol, HEC, quitosana e nanogel, respectivamente. Índices de fluxo menores do que 1 ($n < 1$) são característicos de fluxo pseudoplástico (Aulton, 2005).

Figura 37: Velocidade de cisalhamento [1/s] versus tensão de cisalhamento [Pa] obtidos 24 horas após o preparo das formulações: A) nanogel de poloxamer e B) hidrogel de Carbopol, C) hidrogel de HEC e D) hidrogel de quitosana.

Em relação à viscosidade, os hidrogéis apresentam o mesmo tipo de fluxo e comportamento reológico, no entanto, esses hidrogéis apresentam diferenças em suas estruturas internas.

O poloxamer é um tensoativo sintético, não iônico, composto por blocos hidrofílicos de POE e POP organizados em cadeias na forma de tribloco (OE-OP-OE) com a propriedade de geleificação termorreversível (Wei et al., 2002). Acima da concentração micelar crítica (CMC) este polímero se organiza em micelas. O mecanismo de geleificação da solução de poloxamer está relacionado às propriedades das micelas, como agregação e simetria, que variam com o aumento da temperatura (Rassing, Arrwood; 1983). O hidrogel de poloxamer a 20%, utilizado como meio de acoplamento, apresentou temperatura de transição ($T_{sol/gel}$) de $23,0 \pm 0,4$ °C (Gratieri et al., 2010), com micelas de aproximadamente 13 nm, relativamente baixa polidispersão (0,330) e potencial zeta próximo a neutralidade (aproximadamente +6 mV) (Tabela 5), sendo por esta razão denominado nanogel.

O mecanismo de formação dos hidrogéis de Carbopol, HEC e quitosana está baseado na solubilidade do polímero no meio em função da temperatura e do pH, levando a formação de uma rede polimérica tridimensional, não havendo a formação de micelas ou estruturas particuladas (Dumitriu, 2001). O hidrogel de Carbopol, HEC e quitosana apresentaram características aniônicas, não-iônicas e catiônicas, respectivamente, como indicado pelo potencial zeta de cada uma dessas dispersões (Tabela 9). Essas diferenças estruturais são de grande importância e serão consideradas nas análises dos dados do efeito dos géis no aumento da permeabilidade da pele.

Na Tabela 11 e na Figura 38 tem-se a tensão interfacial das formulações utilizadas como meio de acoplamento.

Tabela 11: Tensão interfacial dos meios de acoplamento utilizados no pré-tratamento da pele com LFU.

Meio de acoplamento	Tensão interfacial (mN.m^{-1})
PBS + SLS 1%	35,93 ($\pm 0,11$)
PBS + CTAB 0,33%	38,10 ($\pm 0,17$)
NLS	30,53 ($\pm 0,15$)
Nanogel	41,63 ($\pm 0,40$)
Hidrogel de quitosana	50,23 ($\pm 1,32$)
Hidrogel de HEC	60,57 ($\pm 0,94$)
Hidrogel de Carbopol	60,83 ($\pm 0,21$)
Nanogel + CTAB 0,33%	60,57 ($\pm 0,94$)
Nanogel + NLS	50,23 ($\pm 1,32$)

Figura 38: Tensão interfacial dos hidrogéis utilizados como meio de acoplamento. A análise estatística foi realizada utilizando One-way ANOVA seguida pelo post test Tukey (n=3) (GraphPad Prism versão 5.0). *p <0,05 vs PBS + SLS 1%, ** p <0,05 vs PBS + CTAB 0,33%, *** p <0,05 vs SLN, **** p <0,05 vs nanogel, # p <0,05 vs hidrogel de HEC, + p <0,05 vs hidrogel de carbopol.

A tensão interfacial de um líquido é um dos fatores básicos que determina o tamanho e a taxa de colapso das bolhas de cavitação durante a aplicação do ultrassom (Kuvshnov, 1991). Ela tem maior efeito sobre a oscilação de uma bolha de cavitação no início da sua

expansão e no final da sua compressão, causando um aumento na taxa de expansão e uma diminuição da taxa de compressão, com a diminuição da tensão interfacial. Desta forma, a atividade sonoquímica é favorecida em líquidos com maior tensão interfacial, os quais levam a colapsos mais violentos das bolhas de cavitação (Polat et al., 2011).

Pode-se observar na Figura 38 que as soluções contendo tensoativo (PBS+SLS, PBS+CTAB) e a dispersão aquosa de NLS (que também tem CTAB em sua composição) apresentaram a menor tensão interfacial, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do valor de tensão interfacial apresentado pelos demais meios. Os tensoativos se adsorvem preferencialmente nas interfaces, com consequente redução da tensão interfacial e formação de uma grande população de pequenas bolhas, as quais são estabilizadas pela ação do tensoativo presente na interface. Quando um ciclo de trabalho do LFU chega ao fim e o ultrassom é desligado, essas bolhas tendem a se dissolver na solução, devido a pressão de LaPlace, não estando mais presentes quando o ultrassom é novamente acionado. Desta forma, um meio de acoplamento que contém tensoativo possui um grande número de pequenas bolhas pouco energéticas. A menor tensão interfacial observada no meio de acoplamento NLS pode ser atribuída à presença da monoleína, um co-tensoativo, e seu efeito sinérgico com o tensoativo catiônico.

Entre os meios de acoplamento viscosos, o nanogel apresentou a menor tensão interfacial, com diferença significativa do valor de tensão interfacial apresentado pelos hidrogéis de quitosana, HEC e Carbopol ($p < 0,05$). O poloxamer 407 é um polímero com propriedades de tensoativo não iônico. A menor tensão interfacial desse hidrogel pode ser atribuída à ação tensoativa do polímero. O hidrogel de quitosana apresentou o segundo menor valor de tensão interfacial, sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do valor de tensão interfacial apresentado pelos hidrogéis de Carbopol e HEC. Os valores de tensão interfacial dos hidrogéis de Carbopol e HEC por sua vez, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p > 0,05$), apresentando os maiores valores de tensão interfacial entre os meios de acoplamento estudados. A adição do CTAB e da NLS ao nanogel não diminuiu a tensão interfacial do gel, como esperado devido a baixa tensão interfacial das soluções que os continha. Pelo contrário, eles a aumentaram provavelmente devido às modificações estruturais causadas no sistema com a adição de outros componentes.

5.7.1. Imagem digital e análise da área das regiões localizadas de transporte (*localized transport regions* - LTRs)

A Figura 39 mostra a porcentagem da área da pele recoberta por LTRs e a Figura 40 mostra a imagem das LTRs formadas na superfície da pele após o tratamento com LFU e os diferentes meios de acoplamento.

Figura 39: % de área de pele ocupada pelas LTRs após tratamento da pele com LFU e diferentes meios de acoplamento. A análise estatística foi realizada utilizando One-way ANOVA seguida pelo post test Tukey (n=10) (GraphPad Prism versão 5.0). *p < 0,05 vs PBS + SLS 1%.

Meio de acoplamento	Imagem nativa	Área quantificada pelo image J
Controle
PBS/SLS
PBS/CTAB
NLS

Nanogel

Nanogel/CTAB

Nanogel/NLS

Carbopol

Quitosana

HEC

Figura 40: Imagem representativa da pele tratada simultaneamente com LFU e diferentes meios de acoplamento. A Imagem Nativa indica a área da pele que foi tratado com LFU e expostas ao corante allura red, a imagem ajustada para quantificação indica o limite da imagem ajustada para quantificação e área quantificada indica área de LTRs quantificada pelo software *imagem J*.

Na pele submetida ao pré-tratamento tradicional utilizando PBS+SLS como meio de acoplamento foi visualizada a formação de uma única LTR (Figura 40), representando $10,67 \pm 16,90$ % da área total da pele exposta ao pré-tratamento (Figura 39), corroborando com dados previamente publicados (Ogura, Pahwal, Mitragotri, 2008). A pele pré-tratada com PBS+SLS apresentou porcentagem significativamente menor ($p < 0,05$) de LTRs do que a pele pré-tratada com PBS+CTAB, Nanogel, nanogel + CTAB, nanogel + NLS e hidrogel de quitosana como meio de acoplamento.

O sinergismo da combinação da sonoforese e promotores de permeação químicos (tensoativos) é o efeito mais significativo observado no aumento da permeação, reduzindo o tempo de aplicação do LFU na pele. Em adição, dois níveis de aumento na permeabilidade da pele são observados quando o promotor químico é associado ao LFU (Polat et al., 2011b), um maior, devido a formação das LTRs, e um menor, que ocorre nas *não*-LTRs devido a

desorganização da pele causada pela maior penetração do promotor químico nessas regiões próximas as LTRs. Os meios de acoplamento contendo soluções de tensoativos, aqui especificamente PBS+SLS e PBS+CTAB, apresentaram a menor tensão interfacial entre os meios de acoplamento estudados (Tabela 11). Quando o LFU foi aplicado no meio que continha PBS+CTAB houve um aumento de aproximadamente 5 vezes na % de LTRs formada na superfície da pele em relação a pele pré-tratada com PBS+SLS, que é considerado o padrão ouro nos estudos de sonoforese.

O CTAB, como o SLS, pode causar alterações nas *não*-LTRs, pois ele é um tensoativo catiônico (16 carbonos), com boas propriedades de promotor de penetração (Tezel et al., 2001). Embora estudos mostrem que os melhores promotores de permeação passivos são aqueles compostos de 12 átomos de carbono, Tezel et al. (2001) mostraram que, quando o LFU é aplicado, existe um aumento do particionamento do soluto no EC modificando o valor máximo do comprimento da cadeia de tensoativos (Tezel et al., 2001). Esses autores observaram que o maior efeito no aumento da condutividade da pele, inversamente relacionada com sua resistência, foi observado com tensoativos com mais de 12 carbonos na cadeia (Tezel et al., 2001). Além disso, tensoativos catiônicos, com o mesmo número de carbonos na cadeia carbônica, se mostraram mais efetivos em aumentar a condutividade da pele (Brometo de (n-decil) trimetilamônio - DTAB diminuiu a resistividade da pele em 35 vezes contra uma diminuição de 25 vezes quando a pele foi exposta ao tensoativo aniônico SLS).

Embora o tensoativo tenha um efeito secundário na melhora da permeabilidade da pele, uma vez que o ultrassom aumenta a habilidade do tensoativo em se difundir dentro da pele, a marcação das LTRs pela coloração com allura red, como feito neste estudo, não marca significativamente as *não*-LTRs. Mas esta marcação pode corar regiões da pele que foram apenas superficialmente modificadas pelas ondas de choque das bolhas em processo de colapso (Wolloch; Kost, 2010) e não só as LTRs. Desta forma, a maior área “corada” da superfície da pele observada quando o PBS+CTAB foi usado em relação ao PBS+SLS pode estar relacionada com um aumento da permeação da pele, mas estudos de penetração cutânea são necessários para comprovar este efeito.

A adição da NLS ao meio de acoplamento mudou o padrão de distribuição das LTRs na superfície da pele (Figura 40). No entanto, apesar de aumentar a porcentagem de LTRs formada ($26,22\% \pm 24,26\%$), não mudou significativamente ($p>0,05$) a superfície total da pele coberta por LTRs em relação ao meio de acoplamento PBS+SLS (Figura 39). Sabe-se que quando as bolhas de cavitação colapsam perto das superfícies sólidas elas originam microjatos

líquidos com alta velocidade (~100 m/s) (Wolloch; Kost, 2010). As NLS parecem ter aumentado o número de microjatos, além de descentralizar os microjatos formados, mudando a distribuição das LTRs na superfície da pele. Esta modificação na distribuição das LTRs pode alterar a penetração de fármacos na pele, mas deve-se levar em consideração que componentes das NLS também podem penetrar mais na pele com a aplicação do LFU e causar modificações no EC. Essas modificações devem ser diferentes das causadas pelos tensoativos devido as características lipídicas das NLS. Estudos têm demonstrado que veículos lipídicos, quando usado em combinação com LFU, podem reparar a pele rompida pelo LFU devido a penetração dos mesmos (Essa et al., 2003, Dahlan et al., 2009). Além disso, podem mascarar a coloração das LTRs devido às características hidrofílicas do corante *allura red* em contraste às características lipofílicas das NLS.

Os hidrogéis são muito utilizados como meios de acoplamento quando o HFU é aplicado (Meidan et al., 1999, Cool et al., 2013) devido a ocorrência da cavitação se dar dentro da pele (Polat et al., 2011b). Desta forma, a melhora na permeabilidade da pele observada quando o HFU é aplicado não sofre influência significativa do meio de acoplamento. Por outro lado, quando o LFU é aplicado há a formação de grandes bolhas de cavitação no meio de acoplamento, perto da superfície da pele. Isto sugere que a influência do meio de acoplamento na desorganização da pele deve ser considerada. No entanto, não existem estudos utilizando hidrogéis com LFU no pré-tratamento da pele. Isto porque a alta viscosidade do géis poderia inibir a cavitação. Tang et al (2002) observou que a utilização do óleo de mamona, um lipídeo líquido de alta viscosidade (viscosidade absoluta de 0,630 – 0,890 Pa.s, Tang et al., 2002) comparado com a água (viscosidade absoluta da água é de 0,89 cp, a 27°C, Kestin, 1978), como meio de acoplamento aumentava a intensidade necessária de aplicação do LFU para que a cavitação ocorresse. Concluiu que a energia mínima de 1,6 W/cm² era necessária (Tang et al., 2002). A intensidade do LFU utilizada em nosso estudo foi de $9,06 \pm 0,5$ W/cm², bem acima, portanto, da mínima necessária para que a cavitação ocorra no meio de acoplamento viscoso.

Quando o pré-tratamento da pele foi realizado utilizando-se o nanogel como meio de acoplamento, contendo ou não CTAB e NLS, as LTRs ocuparam uma área contínua e centralizada (Figura 40), contrária ao padrão não contínuo que é tipicamente formado quando se utiliza PBS+SLS, cobrindo mais de 50% da área da superfície da pele exposta ao pré-tratamento da pele com LFU (Figura 39). Isso sugere que o uso do nanogel como meio de acoplamento ajuda a centralizar a região de LTRs, devido provavelmente a um aumento na atividade e centralização da cavitação onde o ultrassom é aplicado. Além disso, a maior

tensão interfacial do nanogel em relação ao meio contendo PBS+SLS (Tabela 11) pode ter contribuído para o colapso mais energético das bolhas de cavitação que, provavelmente, está relacionado ao maior rompimento da superfície da pele.

Nanogel, hidrogel de quitosana e HEC, embora tenham apresentado diferenças significativas na tensão interfacial ($p < 0.05$) (Tabela 11), resultaram em área da pele recoberta por LTRs semelhante ($55,19 \pm 20,65\%$; $48,28 \pm 15,12\%$ e $36,92 \pm 16,80\%$ para o nanogel, hidrogel de quitosana e HEC, respectivamente) (Figura 39) e com distribuição parecida (Figura 40).

Por outro lado, estes resultados não foram observados quando o hidrogel de Carbopol foi utilizado como meio de acoplamento. Embora este gel tenha apresentado a maior tensão interfacial (Figura 38) e, em tese, choques mais energéticos provocados pelos microjatos (Polat et al., 2011a), este meio de acoplamento apresentou a menor área de LTRs entre os meios de acoplamento viscosos e não apresentou diferença significativa na formação de LTRs na superfície da pele em relação ao meio de acoplamento padrão (PBS+SLS) ($p < 0.05$). Aqui, é importante salientar que a aplicação do LFU perturbou a rede polimérica do gel de Carbopol, resultando em quebra da mesma com subsequente formação de um líquido fluido durante o pré-tratamento. Portanto, o efeito da viscosidade foi negligenciado. Dessa forma, quando meios de acoplamento altamente viscosos são usados, os eventos de cavitação parecem ser mais afetados pela viscosidade do que pela tensão interfacial.

Um aumento na área de LTRs formada após pré-tratamento da pele com sonoforese também foi encontrado por Schoellhammer et al. (2012). Eles observaram a formação de LTRs contínuas e centralizadas quando uma combinação do HFU (1 MHz) e do LFU (20 KHz), posicionados estrategicamente acima da pele (Figura 20), foi utilizada. Como resultado, um total de 27% da área da pele recoberta por LTRs foi observado. Ressalta-se que esse aumento, apesar de significativo, foi ainda cerca de 2 vezes menor do que o por nós alcançado utilizando-se o Nanogel como meio de acoplamento.

Resumidamente, tanto o número de LTRs quanto a sua distribuição parecem estar relacionados à tensão interfacial e a viscosidade do meio. Embora menores tensões interfaciais facilitem a formação de mais bolhas de cavitação, a soma dos choques mais energéticos, resultantes dos meios de acoplamento com maiores tensões interfaciais, com a viscosidade do meio resultou em uma maior área de LTRs, bem como em LTRs melhor distribuídas na superfície da pele. O efeito da viscosidade na formação das LTRs fica claro quando o meio de acoplamento hidrogel de Carbopol é utilizado e sofre quebra sob a aplicação do LFU, resultando na formação de área de LTRs menor do que a formada quando

os demais meios viscosos são usados. Sendo assim, os hidrogéis podem aumentar a área de LTRs por (i) aumentar o número de bolhas de cavitação, uma vez que nesse estudo, os géis não foram degaseificados e, desta forma, continham bolhas de ar aprisionadas na matriz do gel, decorrentes do processo de formulação e da própria manipulação do gel ao ser colocado no compartimento doador da célula de permeação, (ii) as bolhas de cavitação formadas durante um ciclo de trabalho do LFU não devem se dissolver, ou se dissolver mais lentamente no meio, permanecendo neste e, sob a ação de um novo ciclo de trabalho do ultrassom essas bolhas, juntamente com as novas bolhas nucleadas, crescem, colapsam e geram mais microjatos em direção a superfície da pele e, conseqüentemente, mais LTRs e (iii) as redes poliméricas ajudam a centralizar as bolhas de cavitação, resultando em LTRs contínuas e homogeneamente distribuídas na superfície da pele.

5.8 Estudos de permeação cutânea da DOX

5.8.1 Influência de diferentes meios de acoplamento na permeação da DOX

A modificação na permeabilidade da pele como resultado da aplicação do LFU e os diferentes meios de acoplamento foi primeiramente avaliada através do transporte de DOX, na sua forma livre, incorporada no nanogel (Nanogel DOX).

A Figura 41 mostra a quantidade de DOX recuperada do EC e da epiderme viável após 26 h de permeação através da pele pré-tratada com LFU em diferentes meios de acoplamento. De maneira geral, é possível observar que o pré-tratamento aumentou a quantidade em massa de DOX que penetrou a pele em relação à permeação através da pele não tratada com o LFU (passivo). Tanto no EC quanto na epiderme viável, esse aumento foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para todos os meios de acoplamento utilizados, com exceção do meio PBS+CTAB, na epiderme viável. Aqui, é importante notar que, no primeiro momento, apenas o nanogel foi utilizado como meio de alta viscosidade, uma vez que resultou na maior área, em média, de LTRs na superfície da pele pré-tratada com LFU (Figura 39) quando comparado com os demais hidrogéis.

Figura 41: Quantidade de DOX retida no EC (A) e na epiderme viável (B) após o pré-tratamento da pele com LFU e os diferentes meios de acoplamento. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados usando teste T Student não pareado (one tailed). * $p < 0.05$ vs passivo, ** $p < 0.05$ vs PBS + SLS 1%, *** $p < 0.05$ vs NLS, **** $p < 0.05$ vs nanogel + NLS e # $p < 0.05$ vs PBS + CTAB 0,33%.

O EC representa uma barreira à penetração principalmente de fármacos hidrofílicos e macromoléculas. Para que o fármaco alcance as células tumorais, localizadas na epiderme viável, ele precisa entrar no EC e difundir através dele até a epiderme viável. Desta forma, a quantificação da DOX no EC é importante para indicar a massa de fármaco que consegue entrar na pele. Por outro lado, sabe-se que a grande interação da DOX, um fármaco catiônico, com o EC dificulta sua difusão para as camadas mais profundas da pele. Deste modo, o uso de estratégias que aumentem a penetração de fármacos dentro do EC e, consequentemente para a epiderme viável é extremamente vantajosa, uma vez que permite que o fármaco alcance em níveis terapêuticos as camadas mais profundas da pele, onde a maior parte das doenças cutâneas se encontra.

Pode-se observar na Figura 41 que, apenas quando a pele foi pré-tratada com os meios de acoplamento NLS e nanogel+NLS, houve um aumento significativo ($p < 0.05$) na penetração da DOX dentro do EC. Os meios de acoplamento NLS e nanogel+NLS aumentaram a área de LTRs formada na superfície da pele aproximadamente 2,5 e 5 vezes respectivamente (Figura 39) em relação ao pré-tratamento da pele com PBS+SLS. Já o aumento na quantidade de DOX que penetrou no EC foi de aproximadamente 2,5 e 1,6 para os meios de acoplamento NLS e nanogel+NLS, respectivamente, em relação ao meio de acoplamento PBS+SLS. É interessante notar que, o meio de acoplamento distinto do

tradicional (PBS+SLS) que resultou em menor aumento na formação de LTRs na superfície da pele, as NLS ($26,22 \pm 24,06\%$) (Figura 39), levou a uma maior penetração da DOX dentro do EC (Figura 41).

Por outro lado, foi possível observar que o maior transporte sonoforético da DOX para a epiderme viável foi observado quando os meios de acoplamento compostos pelo nanogel (nanogel, nanogel+CTAB, nanogel+NLS) foram utilizados no pré-tratamento da pele. No entanto, o aumento do transporte sonoforético da DOX para a epiderme foi significativo ($p < 0.05$) apenas quando o meio de acoplamento nanogel+NLS foi utilizado, em relação ao meio padrão, PBS+SLS. No experimento de quantificação das LTRs formadas (Figura 39 e 40), os meios de acoplamento compostos pelo nanogel resultaram no maior número de LTRs na superfície da pele juntamente com o meio de acoplamento PBS+CTAB. Esses meios aumentaram em aproximadamente 5 vezes a área de LTRs formada na superfície da pele em relação ao meio padrão, PBS+SLS. No entanto, não houve um aumento na penetração da DOX na epiderme viável quando foram utilizados os meios nanogel e nanogel+CTAB e, quando o meio de acoplamento nanogel+NLS foi utilizado, esse aumento foi de apenas 1,5 vezes em relação ao meio de acoplamento padrão.

Com base nos resultados, pode-se inferir que:

- A % de área corada na superfície da pele quantificada quando o meio de acoplamento PBS+CTAB foi usado pode ser resultado mais das ondas de choque do que dos microjatos formadores de LTRs, uma vez que não foi observada a penetração do fármaco até as camadas mais profundas da pele. Ainda, a penetração do CTAB, molécula catiônica, no EC antes da administração da DOX pode ter dificultado a penetração da DOX, também catiônica, por repulsão.
- O meio de acoplamento padrão, PBS+SLS, o qual levou a formação de uma menor área de LTRs na superfície da pele ($10,67 \pm 16,90\%$) (Figura 39), resultou em uma penetração da DOX na epiderme viável semelhante aos meios de acoplamento compostos pelo nanogel e pelo nanogel+CTAB, os quais levaram a formação de uma área de LTRs 5 vezes maior do que o tratamento com o PBS+SLS. O efeito promotor de penetração do SLS nas *não*-LTRs aliado ao residual de cargas negativa deste tensoativo ($-13,83 \pm 3,20$ mV), que não tem o potencial de repelir a DOX catiônica, certamente contribuíram para a maior penetração da DOX quando este meio foi usado.
- A NLS aumentou a quantidade de DOX no EC possivelmente porque sua presença no meio de acoplamento levou a uma maior desestruturação do EC em relação ao meio de acoplamento padrão, PBS+SLS, devido a formação de mais microjatos quando as

bolhas de cavitação colapsavam perto das superfícies sólidas das nanopartículas, rompendo toda a espessura do EC. No entanto, essa desestruturação não foi completamente quantificada macroscopicamente através da imagem das LTRs (Figura 40) devido a uma possível reparação da pele desestruturada pelo material lipídico da própria nanopartícula (Dahalan et al., 2009). Desta forma, o pré-tratamento da pele com LFU e NLS como meio de acoplamento resultou em maior penetração da DOX dentro do EC, mas diminuiu um pouco sua difusão para as camadas mais profundas devido a provável interação da DOX com os componentes da NLS presentes no EC pré-tratado.

- Por outro lado, o pré-tratamento com as NLS incorporadas no nanogel (nanogel+NLS) deve colocar no EC, principalmente nas LTRs, não somente componentes da NLS, mas também do nanogel. Esta alteração na composição das LTRs pode ter contribuído para a maior difusão da DOX para camadas mais profundas da pele em relação a pele pré-tratada apenas com a NLS.

- A penetração da DOX quando a pele foi pré-tratada usando os meios de acoplamento viscosos (nanogel, nanogel + NLS e nanogel + CTAB) não foi proporcional ao aumento das LTRs. Mais especificamente, em relação ao tratamento convencional com SLS (LFU/SLS), os meios viscosos aumentaram 5 vezes as LTRs mas, apenas o meio nanogel + NLS resultou em um aumento de 1,7 vezes na penetração da DOX, enquanto não houve diferença na quantidade de DOX na epiderme viável quando seu pré-tratamento foi realizando usando nanogel e nanogel + CTAB. Acredita-se que as LTRs sejam canais aquosos capazes de aumentar o transporte de fármacos hidrofílicos, como é o caso da DOX. Baseado na hipótese da formação de canais aquosos na pele de diferentes tamanhos, as moléculas podem difundir apenas através dos maiores canais aquosos formados, como observado por Shoellhammer et al. (2012) na permeabilidade da glicose e inulina após pré-tratamento da pele com LFU de baixa e alta frequência. Em adição, este aumento na penetração não proporcional às LTRs pode estar relacionado à alta interação da DOX com o EC (Heraí et al., 2007, Taveira et al., 2009). Isto é, apesar do LFU desorganizar o EC, interações do fármaco catiônico com os lipídeos da pele ainda ocorrem, dificultando sua difusão.

- Fica evidente que, além da formação, distribuição e profundidade das LTRs na superfície da pele, as características do meio de acoplamento, quando este está presente dentro da pele, influenciam na penetração da DOX, uma vez que a aplicação do LFU aumenta a penetração do meio de acoplamento dentro da pele.

O meio receptor foi analisado no final de todos os experimentos, mas não foi possível quantificar a DOX em nenhum deles. A ausência de DOX no receptor é outro

parâmetro de grande interesse para o objetivo proposto, pois indica a ausência de distribuição sistêmica do fármaco, que apresenta sérios efeitos colaterais, principalmente cardíacos, quando é administrado de forma sistêmica.

5.8.2 Influência de diferentes meios de acoplamento na permeação da NLS-DOX

Diversos estudos têm mostrado que NLS, quando aplicadas topicamente, são capazes de direcionar fármacos para a epiderme viável (Schlupp et al., 2011). Em adição, estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório mostraram que a DOX interage fortemente com o EC (Herai et al., 2007, Taveira et al., 2009), o que dificulta sua difusão para a epiderme. Desta forma, a encapsulação da DOX em NLS poderia, em tese, diminuir a interação do fármaco com o EC, além de aumentar a estabilidade do fármaco e direcionar sua penetração para as camadas mais profundas da epiderme. De fato, Taveira et al. (2014) observaram que a encapsulação da DOX em NLS compostas por ácido esteárico, lecitina de soja e taurodeoxicolato de sódio aumentou a permeação e retenção da DOX nas camadas mais profundas da pele após administração passiva. Recentemente, Huber et al., 2015 observou que a penetração da DOX na epiderme viável, após 1 hora de penetração passiva, a partir da dispersão aquosa de NLS-DOX usada neste trabalho foi 3,4 vezes maior quando comparada a uma solução do fármaco. Desta forma, o efeito da NLS associado ao pré-tratamento da pele com o LFU, o qual aumentou significativamente a quantidade do fármaco livre na epiderme, poderia ser vantajoso para o tratamento do câncer de pele. Então, experimentos com LFU foram realizados para avaliar o efeito das LTRs hidrofílicas na permeação da NLS-DOX incorporada no nanogel.

A Figura 42 mostra a quantidade de DOX permeada na pele após o pré-tratamento com o LFU utilizando diferentes meios de acoplamento a partir do nanogel NLS-DOX.

Figura 42: Quantidade de DOX retida no EC (A) e na epiderme viável (B) após o pré-tratamento da pele com LFU e diferentes meios de acoplamento a partir do nanogel NLS-DOX. Os estudos foram conduzidos utilizando os mesmos parâmetros de LFU para os diferentes meios de acoplamento. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados usando teste T Student não pareado. * $p < 0.05$ vs passivo, ** $p < 0.05$ vs PBS + SLS 1%, *** $p < 0.05$ vs NLS, **** $p < 0.05$ vs nanogel + NLS e # $p < 0.05$ vs PBS + CTAB 0,33%.

Ao contrário do que foi observado por Huber et al. (2015) com a dispersão de NLS-DOX, o nanogel NLS-DOX não aumentou a penetração e retenção do fármaco no EC quando comparado ao fármaco livre. Pode-se observar que a quantidade de fármaco retida no EC quando o nanogel NLS-DOX foi administrado passivamente (sem pré-tratamento com LFU) foi aproximadamente 1,8 vezes menor do que o observado nos experimentos passivos realizados com a DOX livre, após 26 horas de permeação (Figura 42). O mesmo foi observado para o fármaco retido na epiderme viável, sendo que a quantidade de DOX que penetrou até a epiderme viável quando o nanogel NLS-DOX foi administrado foi 1,4 vezes menor do que quando a DOX foi administrada livre no nanogel. Tal comportamento pode ser devido à incorporação das NLS no nanogel, que apresenta mesofases líquido cristalinas (Tabelas 7 e 8 e Figura 31). Essas mesofases têm como principal característica sustentar a liberação do fármaco (Figura 36). Ainda, como observado nos estudos de SAXS, a DOX encapsulada parece estar localizada nas cadeias apolares da rede cristalina do gel, mas a DOX não encapsulada (pois a mesma não foi separada da dispersão de NLS) parece estar localizada internamente, no domínio aquoso da fase cúbica (Tabela 8). Desta forma, nem o fármaco livre nem o encapsulado estão facilmente disponíveis para a penetração quando a NLS-DOX é

incorporada no nanogel, o que diminui, ou retarda, a penetração cutânea da DOX em relação a sua penetração a partir de uma solução de DOX ou uma dispersão simples de NLS-DOX.

Após a aplicação do LFU na pele com diferentes meios de acoplamento, pode-se observar que os meios que levam a uma maior desorganização da pele (nanogel, nanogel + CTAB e nanogel + NLS) (Figura 39) resultaram em menor retenção e penetração da DOX no EC e epiderme viável, respectivamente. Alguns estudos têm mostrado que carreadores lipídicos associados a métodos físicos, como eletroporação e iontoforese, podem diminuir o transporte transdérmico de fármacos quando comparado a solução do fármaco (Essa et al., 2003). Essa redução pode estar associada à reparação da pele pelos lipídeos presentes na formulação (Essa et al., 2003). Dahlan et al., 2009 mostraram que lipossomas com tamanho de aproximadamente 80 nm podem adsorver e fundir na superfície da pele, acomodando-se especialmente nos espaços lacunares criados pelo LFU. Desta forma, esses sistemas de liberação lipídicos parecem repor o conteúdo lipídico da pele, extraído durante a sonicação, resultando em menor penetração do fármaco. Tal fato pode ser associado às NLS, que podem fundir com a superfície da pele, bloqueando as LTRs formadas na pele pré-tratada com LFU, resultando em menor penetração da DOX encapsulada quando comparada a DOX livre. Desta forma, a maior penetração do fármaco dar-se-á através das *não*-LTRs, ou na pele pré-tratada com os meios de acoplamento contendo tensoativos (PBS+SLS e PBS+CTAB), que agem como promotores de absorção (Figura 42).

Em adição, baseado no modelo de formação de canais aquosos na pele, o transporte sonoforético depende da relação entre o tamanho do permeante e dos poros aquosos formados após o pré-tratamento da pele com o ultrassom, além de sua hidrofília (Schoellhammer et al., 2012). Benson et al., 1991 avaliaram a liberação sonoforética (frequência de 3MHz e intensidade de 1,0 W/cm²) de 3 ésteres nicotínicos e observaram uma maior permeação para os dois ésteres mais hidrofílicos. Segundo os autores, uma possível explicação é que a desorganização estrutural dos lipídeos do EC poderia resultar em um maior efeito para permeantes hidrofílicos. Mais tarde, tais autores confirmaram essa hipótese, atribuindo a melhora na permeação ao tamanho da molécula (McElnay 1993).

Desta forma, a menor penetração da DOX encapsulada em relação ao fármaco livre pode ser provavelmente devido ao aumento no tamanho da molécula, como evidenciado por Benson et al., 1991 e McElnay et al., 1993, com a possível formação do par iônico DOX-ácido esteárico lipofílico e a redução dos poros formados através da reparação das LTRs pelo material lipídico das nanopartículas. Além disso, a encapsulação da DOX aumentou as

características hidrofóbicas da DOX (Figura 27), dificultando sua penetração pelos canais hidrofílicos que compõem as LTRs.

5.8.3 Influência do potencial zeta dos meios de acoplamento compostos por géis na permeação da DOX

Nos estudos de penetração cutânea da DOX, um fármaco hidrofílico, na pele pré-tratada com LFU e diferentes meios de acoplamento (item 5.8.1), ficou evidenciado que o potencial zeta dos meios de acoplamento poderia influenciar na penetração do fármaco. Isto porque o aquecimento do meio de acoplamento e as microcorrentes formadas sob a aplicação do LFU aumentam o fluxo dos componentes que formam o meio de acoplamento para dentro da pele (Polat et al. 2011b), modificando suas características. Como a DOX apresenta residual de cargas positivo, um dos responsáveis por sua interação com o EC, que apresenta residual de cargas negativo (Taveira et al., 2009), a diferença de potencial zeta dos géis que compõem o meio de acoplamento poderia influenciar na extensão de sua penetração na pele.

A Figura 43 mostra a quantidade de DOX recuperada do EC e da epiderme viável após 26 h de contato com a pele pré-tratada com LFU e géis hidrofílicos com diferentes potenciais zeta.

Figura 43: Quantidade de DOX retida no EC (A) e na epiderme viável (B) após o pré-tratamento da pele com LFU e os diferentes géis hidrofílicos (gel catiônico: quitosana, gel não-iônico: HEC, gel aniônico: Carbopol). Os estudos foram conduzidos utilizando os mesmos parâmetros de LFU para os diferentes meios de acoplamento. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=6). Os resultados foram analisados de acordo com o método de análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0.05$ vs hidrogel aniônico, ** $p < 0.05$ vs hidrogel de catiônico.

O pré-tratamento com o LFU/gel aniônico (Carbopol) foi o que mais aumentou a penetração do fármaco, 4,8 vezes mais do que o LFU/gel catiônico (quitosana) e aproximadamente 2 vezes mais do que o LFU/gel não iônico (HEC) e o LFU/nanogel, que também tem características não iônicas (Tabela 9). O hidrogel que resultou na formação de menor área de LTRs (Figura 39 e 40) foi, neste caso, o que mais aumentou a penetração da DOX. Parece, portanto, que a penetração cutânea da DOX não está apenas relacionada à maior permeabilização da pele causada pelo LFU, mas também às interações da DOX com a pele, a qual sofre, por sua vez, influência do potencial zeta dos géis. Mais especificamente, a quitosana, por exemplo, apesar de ser um reconhecido promotor de permeação cutânea (He, Guo, Zang; 2008) e ter formado regiões de transporte localizadas em 48% de área da pele (Figura 39), foi o gel que resultou em menor aumento na penetração da DOX (Figura 43). Nosso grupo já demonstrou em outra ocasião que o hidrogel catiônico de quitosana exerce uma influência negativa na penetração da DOX quando a iontoforese, método físico que utiliza uma corrente elétrica de baixa intensidade para aumentar a penetração de fármacos na pele, é usada (Taveira et al., 2009). Da mesma forma que aconteceu com a iontoforese, a aplicação do LFU pode ter aumentado a captação do polímero catiônico dentro da pele, o qual pode competir com a DOX, também catiônica, diminuindo sua interação com o EC negativamente carregado, resultando na menor penetração da DOX na pele pré-tratada com LFU utilizando o hidrogel catiônico de quitosana como meio de acoplamento.

Por outro lado, o hidrogel aniônico de Carbopol, apesar de formar menos LTRs do que o de quitosana (Figura 39), aumentou mais a penetração da DOX catiônica na pele. Já os polímeros não iônicos de HEC e de poloxamer (nanogel) levaram a uma penetração intermediária do fármaco. Em todos os casos, parece que o polímero ocupa as LTRs e acaba por interagir com o fármaco que atravessa a pele por essas regiões. O polímero catiônico (quitosana) prejudica a entrada da DOX, também catiônica, enquanto que o polímero aniônico facilita esta penetração. O hidrogel de HEC não apresentou diferenças estatisticamente significativas na formação de LTRs (Figura 39) bem como na quantidade de DOX permeada no EC e epiderme viável quando comparado ao nanogel (Figura 43). Apesar de serem constituídos por polímeros diferentes, ambos os hidrogéis são não iônicos, não interferindo na penetração do fármaco positivamente carregado na pele permeabilizada pelo LFU.

Os resultados acima nos permite concluir que a penetração do fármaco na pele pré-tratada com o LFU depende tanto das LTRs como das interações do fármaco com o polímero utilizado no meio de acoplamento. Desta forma é possível definir meios de acoplamento que

contribuam com a formação de LTRs homogêneas e que favoreçam a difusão do fármaco pela pele.

5.8.4. Estudos de permeação cutânea da calceína

A calceína é um fluoróforo hidrofílico, negativamente carregado, incapaz de permear passivamente o EC em quantidade e extensão significativas. No entanto, estudos prévios realizados por Alvarez-Roman et al., 2003 mostraram que o pré-tratamento da pele com LFU/SLS aumentou significativamente a permeação da calceína através da pele. Imagens de microscopia confocal da superfície da pele pré-tratada mostraram uma pequena área, de aproximadamente 1 cm², com alta concentração do fluoróforo, sugerindo a formação de uma única LTR, enquanto as áreas adjacentes (*não*-LTRs) apresentavam baixa concentração da calceína, ou seja, foram pouco afetadas pela aplicação do LFU/SLS. Somando-se a isto, Kushner, Blakschtein, Langer; 2004 mostraram que vedando-se hora a área de LTRs e hora a área de *não*-LTRs com parafina e quantificando, em cada um dos casos, a quantidade de calceína que permeava através da pele, a quantidade de calceína que permeava através da área total da pele (área de LTRs + *não*-LTRs) era semelhante àquela apresentada pela pele onde as *não*-LTRs eram recobertas por parafina, sugerindo que o aumento da permeação da calceína através da pele pré-tratada com LFU/SLS ocorre preferencialmente pela LTR formada após sua aplicação.

Portanto, a formação de LTRs na superfície da pele é uma ferramenta útil na avaliação da eficácia do pré-tratamento da pele com LFU e pode ser utilizada como parâmetro em estudos que utilizam condições diferentes daquelas dos estudos conduzidos até o presente momento. Nós observamos que o uso de hidrogéis como meio de acoplamento aumentavam o número e extensão de LTRs na pele (Figura 39). No entanto, observamos também que o aumento das LTRs não foi diretamente proporcional a quantidade permeada do fármaco hidrofílico catiônico DOX (Figura 41). Desta forma, decidiu-se utilizar a calceína como fármaco modelo hidrofílico aniônico para verificar a influência do meio de acoplamento na formação de LTRs e permeação de fármacos no pré-tratamento da pele com LFU.

A Figura 44 mostra a quantidade de calceína transportada através da pele para cada um dos meios de acoplamento utilizados.

Figura 44: Calceína permeada através da pele, *in vitro*, após pré-tratamento com LFU e diferentes hidrogéis como meio de acoplamento: (i) nanogel (não iônico), (ii), hidrogel de quitosana (gel catiônico) e (iii) hidrogel de Carbopol (gel aniônico). Os estudos foram conduzidos utilizando os mesmos parâmetros de LFU para os diferentes meios de acoplamento. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=5). Os resultados foram analisados de acordo com o método de análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, com $p < 0.05$ como nível mínimo de significância.

Pode-se observar na Figura 44 que o pré-tratamento com LFU/nanogel, que recobre 55% da superfície da pele com LTRs (Figura 39), resultou em $220 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de calceína permeada. Usando parâmetros experimentais de LFU similares aos utilizados nesse estudo (intensidade $7,2 \text{ W}/\text{cm}^2$, ciclo de trabalho 5 s On, 5 s OFF, sonda do US a 3 mm da superfície da pele), mesma concentração de calceína na solução doadora, porém SLS como meio de acoplamento, Kushner, Blankschtein, Langer; 2004, mostraram que 17 e $45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de calceína permearam a pele. No caso deles, no entanto, a pele foi pré-tratada com o LFU até adquirir resistividade elétrica de $0,380 \text{ K}\Omega.\text{cm}^2$ e $0,150 \text{ K}\Omega.\text{cm}^2$, respectivamente, para resultar na permeação de 17 e $45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. A resistividade da pele é a medida quantitativa da integridade estrutural da superfície da pele, portanto, quanto maior a resistividade, mais íntegro está o EC. Em nossos estudos, a pele foi pré-tratada até atingir a resistividade elétrica de $1 \text{ K}\Omega.\text{cm}^2$ (resistividade utilizada nos estudos clínicos com LFU - Farinha et al., 2006), ou seja, aproximadamente 2,5 vezes maior do que o tratamento mais suave ($0,380 \text{ K}\Omega.\text{cm}^2$) utilizado nos estudos conduzidos por Kushner, Blankschtein, Langer; 2004. Desta forma, o pré-tratamento da pele com o LFU/nanogel resultou em um aumento de aproximadamente 7

vezes da quantidade de calceína permeada através da pele em relação ao pré-tratamento com LFU/SLS. Estima-se que o aumento da quantidade de calceína permeada seria ainda maior se a pele tivesse sido pré-tratada com LFU/nanogel até valores de resistividade elétrica menores.

Por outro lado, a influência das características do meio de acoplamento na permeação da calceína continuou a ser notada, como já observado na permeação da DOX (Figura 43). Apesar de não ser estatisticamente significativo ($p > 0.05$), houve a tendência de uma maior permeação da calceína na pele pré-tratada com LFU/gel catiônico (quitosana). A menor permeação da calceína foi observada quando o meio de acoplamento aniônico (gel de Carbopol) foi utilizado no pré-tratamento da pele. Esses resultados são o oposto do observado nos estudos com a DOX, no qual o LFU/gel aniônico foi a condição que resultou em maior aumento da permeação do fármaco. Parece que o potencial zeta do meio de acoplamento influencia na permeação do fármaco de maneira dependente da dissociação do fármaco. Mais especificamente, a calceína, que se apresenta em sua forma aniônica no pH da solução em que foi dispersa, permeia mais quando o meio de acoplamento é catiônico (quitosana) (Figura 44); já a DOX, que se apresenta na forma de cátions na formulação doadora, permeia mais quando o meio de acoplamento é aniônico (Carbopol).

Portanto, os resultados apresentados acima sugerem que a aplicação de LFU com hidrogéis como meio de acoplamento é uma alternativa simples e efetiva para aumentar a penetração de fármacos na pele e esta penetração pode ser modulada em função do potencial zeta do meio de acoplamento.

Desta forma, o pré-tratamento com LFU/nanogel foi investigado na terapia tópica do câncer de pele com DOX, como descrito a seguir. O nanogel foi utilizado como meio de acoplamento por (i) apresentar a maior área de LTRs na superfície da pele, (ii) ser de fácil aplicação devido a característica de gel termorreversível, (iii) ser um polímero não tóxico, devido ao caráter não iônico (em relação ao meio de acoplamento contendo tensoativo catiônico - CTAB e aniônico - SLS) e (iv) a habilidade dos poloxamer em superar o efeito MDR – *multi drug resistance*, ou o desenvolvimento, por parte das células tumorais, de resistência aos fármacos, um dos maiores obstáculos no tratamento do câncer (Kunjachan et al., 2013).

5.9. Estudos *in vivo* com LFU/nanogel em tumores cutâneos

O sucesso clínico da quimioterapia é particularmente baixo no tratamento de tumores sólidos (Tannock et al., 2002), uma vez que o desenvolvimento da vasculatura intratumoral irregular e da matriz extracelular de células tumorais levam a uma diminuição da penetração

eficiente de fármacos dentro do tumor, quando estes são administrados de forma a distribuírem-se sistemicamente. Desta forma, para melhorar a efetividade terapêutica do tratamento de tumores sólidos, como o câncer de pele, novas estratégias de tratamento são necessárias para superar as barreiras de penetração de fármacos dentro do tumor.

Atualmente, as estratégias de tratamento para o câncer de pele envolvem a cirurgia seguida pela quimioterapia ou radioterapia, como forma de tratar os resíduos de tumor nas margens do mesmo, evitando assim a recorrência. No entanto, esses tratamentos levam a sérios efeitos colaterais físicos e emocionais resultantes da quimioterapia e do processo cirúrgico, que levam a uma baixa adesão do paciente ao tratamento.

Desta forma, tendo como base os resultados *in vitro* do aumento da permeabilidade da DOX na pele pré-tratada pelo LFU/nanogel, nós estimamos que essa estratégia, não invasiva, possa auxiliar no tratamento tópico do câncer de pele. Essa estratégia pode localizar a terapia no sítio de ação, diminuindo os efeitos adversos e consequentemente aumentando a eficácia do tratamento, além de ser um tratamento inovador, uma vez que não existem relatos na literatura do uso do LFU no aumento da permeabilidade da pele para o tratamento de tumores cutâneos.

5.9.1. Padronização do tempo de pré-tratamento da pele *in vivo* usando LFU/nanogel

Muitos estudos *in vivo* com LFU monitoram a resistividade elétrica da pele durante a aplicação do ultrassom, pois a rapidez com que a desorganização do EC, requerida para aumentar a permeabilidade do fármaco, é alcançada depende das condições de integridade e elasticidade iniciais da pele (Karande, Jain, Mitragotri; 2006), que, obviamente, varia de indivíduo para indivíduo. Estudos iniciais de LFU/SLS *in vivo* realizados por Tezel e colaboradores determinaram a resistividade da pele inserindo um eletrodo de Ag/AgCl subcutaneamente na região dorsal, próximo a cabeça, de camundongos (Tang, Blankschtein, Langer, 2002). Como esta técnica é invasiva e não indicada para ser utilizada em camundongos imunodeficientes como os usados em nosso estudo, foi padronizada uma técnica para a determinação da resistividade da pele *in vivo* de maneira não invasiva, com o simples acoplamento de um *patch* contendo eletrodo de Ag/AgCl na cauda do camundongo. Este eletrodo é rotineiramente utilizado em estudos de iontoforese como contra-eletrodo (Gelfuso et al., 2011).

Para validar o método, a resistividade elétrica foi determinada *in vivo*, seguida da dissecação desta mesma pele, montagem em uma célula de difusão e determinação da

resistividade *in vitro*. A Tabela 12 mostra os valores de resistividade elétrica da pele medidos *in vivo* e após a dissecação da pele do camundongo (*in vitro*).

Tabela 12: Resultados da medida da resistividade elétrica da pele *in vivo* e *in vitro* para avaliação da efetividade do protocolo de medida da resistividade da pele *in vivo*. Pele pré-tratada com LFU/nanogel na intensidade $9,6 \pm 0,5 \text{ W/cm}^2$, ciclo de trabalho 5 s ON, 5 s OFF por 1 min, distância da sonda do LFU da superfície da pele de 3 mm, tratada até aproximadamente $1 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$.

Camundongo	Número de aplicações para atingir resistividade elétrica desejada	Resistividade elétrica ($\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$)	
		<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
1	1	3,17	2,67
2	3	2,61	2,36
3	1	2,96	3,22

Pode-se observar na Tabela 12 que houve uma correlação entre os valores de resistividade elétrica da pele obtidos após o pré-tratamento *in vivo* e *in vitro*. Desta forma, a ligação de um eletrodo Ag/AgCl superficialmente na cauda do camundongo mostrou-se uma técnica não invasiva eficiente, adequada aos objetivos do estudo *in vivo* de regressão tumoral proposto.

No entanto, houve uma elevação da temperatura do meio de acoplamento ($43\text{-}44^\circ$) usando 1 min de aplicação do LFU nas condições padronizadas, resultando em machucados na pele dos camundongos (Figura 45), mesmo sem atingir-se a resistividade elétrica desejada de $1 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$.

Figura 45: Imagens da pele pré-tratada com LFU/nanogel. Condições experimentais: intensidade $9,6 \pm 0,5 \text{ W/cm}^2$, ciclo de trabalho 5s ON, 5s OFF, tempo de cada pré-tratamento 1 minuto, sonda a 3 mm da superfície da pele. As setas indicam o local da lesão.

Desta forma, foram realizados uma série de pré-tratamentos variando-se o tempo de cada ciclo de aplicação do LFU/nanogel (30 s, 20 s, 10 s e 5 s) e verificando-se o aparecimento de lesões (Tabela 13).

Tabela 13: Tempo e número de ciclos (5 s ON, 5 s OFF) de aplicação do LFU/nanogel necessários para causar lesão na pele de camundongos sem pelo.

Tempo de cada ciclo	Número de ciclos necessários para visualizar o aparecimento da lesão	Resistividade elétrica alcançada ($K\Omega \cdot cm^2$)
30*	$3,0 \pm 0,0$	$4,54 \pm 0,73$
20**	$2,5 \pm 0,7$	$5,15 \pm 0,13$
10**	$2,5 \pm 0,7$	$3,24 \pm 0,77$
5**	***	$1,94 \pm 0,28$

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (n=2).

* Sonda posicionada 3 mm acima da superfície da pele.

** Sonda posicionada 5 mm acima da superfície da pele.

*** Não foram observadas lesões em nenhum dos 3 camundongos tratados. Número de ciclos para atingir resistividade elétrica de $\sim 1 K\Omega \cdot cm^2$ foi de 3 ± 1 .

A Figura 46 mostra imagens representativas do aspecto da pele dos camundongos sem pelo após os diferentes tempos de tratamento com o LFU/nanogel.

Figura 46: Imagens representativas da pele de camundongos sem pelo pré-tratada com LFU/nanogel. Condições experimentais: intensidade $9,6 \pm 0,5 W/cm^2$, sonda distante 3 mm da superfície da pele em (A) e 5 mm em (B), (C) e (D), ciclo de trabalho 5s ON, 5s OFF, tempo de cada ciclo: A) 30 s, B) 20 s, C) 10, D) 5 s.

Pode-se observar na Tabela 13 e na Figura 46 que a resistividade elétrica de $1 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$ foi alcançada sem causar lesões na pele somente quando ciclos de apenas 5 s, ou seja, de 5 s ON:5 s OFF, foram aplicados, sendo necessários aproximadamente 3 ciclos destes para atingir a resistividade desejada, ou seja, 15 s. Ainda, decidiu-se posicionar a sonda 5 mm acima da superfície da pele a partir da aplicação de 20 s para diminuir a magnitude das lesões. Tezel e colaboradores (Tezel et al., 2005) pré-trataram a pele de camundongos BALB/c até a mesma atingir uma resistividade elétrica abaixo de $5 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$ e, para isso, foram necessários 2 ciclos (5 s ON:5 s OFF) de 40 s cada com a sonda distante 5 mm da superfície da pele. No entanto, neste estudo eles utilizaram uma intensidade de LFU de $2,4 \text{ W/cm}^2$, intensidade esta 4 vezes menor do que a utilizada no presente trabalho. Para atingir a resistividade elétrica de aproximadamente $1 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$ aplicando o LFU na intensidade de $9,6 \text{ W/cm}^2$ precisamos de um tempo de aplicação total cerca de 4 vezes menor do que Tezel et al., 2005. Desta forma, nossos resultados de tempo de pré-tratamento da pele para alcançar um valor de resistividade elétrica desejado ($1 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$) corroboram com os resultados encontrados por esses autores.

Sendo assim, definiu-se que o pré-tratamento dos tumores com LFU/nanogel seria feito posicionando-se a sonda do ultrassom 5 mm acima da superfície do tumor e aplicando-se ciclos 5 s ON:5 s OFF de 5 s até que a resistividade atingisse o valor aproximado de $1 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$. Aqui, cabe ressaltar que os estudos de padronização do tempo de pré-tratamento da pele *in vivo* foram realizados em camundongos *hairless*, em pele saudável, sem o desenvolvimento tumoral.

5.9.2. Tratamento tópico do carcinoma de células escamosas usando LFU/nanogel e DOX

Na primeira série de pré-tratamento dos tumores nas condições padronizadas de LFU observou-se, primeiramente, que as medidas de resistividade elétrica registradas pelo multímetro não alcançavam a resistividade pré-determinada ($1 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$) em vários dos animais tratados, mesmo após 3-4 aplicações do LFU/nanogel. Mas após este número de aplicações pequenas lesões na pele de alguns dos animais eram observadas. Tal fato pode ser atribuído a hiperqueratinização do tumor. O tumor induzido nos camundongos se caracteriza pela multiplicação rápida e descontrolada dos queratinócitos, havendo uma superprodução de queratina. Parece que o excesso de queratina impede a passagem da corrente elétrica através da pele, registrando altos valores de resistividade elétrica mesmo quando o EC já está modificado pelo ultrassom. Desta forma, com o intuito de não lesar a pele dos animais, decidiu-se padronizar o número de aplicações ao invés da medida de resistividade. Como a

aplicação de 3 ciclos de 5 s (5 s ON:5 s OFF) do LFU/nanogel resultou na permeabilização da pele da grande maioria dos animais sem tumor tratados no estudo de padronização descrito anteriormente (Tabela 13 e Figura 46-D) definiu-se utilizar este protocolo nos estudos nos tumores. Mesmo assim observaram-se pequenas lesões em alguns dos animais quando o ultrassom era posicionado a 5 mm da superfície do tumor. Desta forma, decidiu-se estudar também, em outro grupo de animais, o efeito do LFU/nanogel com a sonda posicionada a 10 mm de distância da superfície do tumor.

A Figura 47 mostra o volume do tumor em função do tempo, para os grupos que receberam diferentes tratamentos.

A)

B)

Figura 47: Crescimento tumoral após tratamento tópico: A) sem pré-tratamento com LFU: (■) grupo controle, o qual não recebeu qualquer tipo de tratamento, (▼) aplicação tópica do nanogel contendo DOX. B) pré-tratamento com LFU/nanogel seguido da aplicação do nanogel contendo DOX: (■) grupo controle, (▲) sonda posicionada à 5 mm de distância da

superfície da pele (●) sonda posicionada à 10 mm de distância da superfície da pele. * $p < 0.05$ vs. controle. Analizado por teste T Student não pareado (one tailed).

Pode-se observar na Figura 47 A que os animais que não foram submetidos ao pré-tratamento com o LFU, mas que receberam a aplicação tópica diária do nanogel DOX, não apresentaram regressão tumoral significativa em relação ao controle ($p > 0,05$) (o qual não recebeu qualquer tipo de tratamento).

O pré-tratamento da pele com o LFU/nanogel antes da aplicação diária do nanogel DOX levou a resultados distintos e interessantes dependendo da distância na qual a sonda do LFU foi posicionada da superfície do tumor. Posicionada à 5 mm da superfície do tumor, o pré-tratamento com LFU/nanogel não suprimiu o crescimento tumoral (Figura 47 B). Tezel et al., 2005 observaram que a aplicação do LFU na pele saudável de camundongos, em condições experimentais similares as utilizadas neste estudo, com a sonda do LFU posicionada também a uma distância de 5 mm da superfície da pele foi capaz de ativar as células de Langherans, desencadeando uma resposta imune. Somando-se a isto, Sorace et al., 2013 observaram que a aplicação de HFU em camundongos causava um maior crescimento de tumores de cabeça e pescoço parcialmente removidos e sugeriram que este aumento estava relacionado a uma resposta do organismo frente a um tecido danificado, resultando em reparação do mesmo, com subsequente crescimento celular tumoral. Desta forma, o crescimento tumoral observado no grupo LFU com a sonda posicionada à 5 mm da superfície do tumor pode estar também relacionado a uma lesão causada ao tecido pela aplicação do LFU, que desencadeou resposta de reparo e o consequente crescimento tumoral (Figura 47 B). No entanto, o crescimento parece não ter sido maior do que o do tumor controle devido, provavelmente, ao efeito supressor da DOX administrada em associação.

O distanciamento da sonda do LFU para 10 mm da superfície do tumor resultou numa diminuição significativa do crescimento tumoral (Figura 47 B) em relação a todos os grupos estudados. O maior distanciamento da sonda parece ter diminuído a intensidade da energia liberada pelas bolhas de cavitação que chega a superfície da pele, energia esta resultante do colapso dessas bolhas no meio de acoplamento, refletindo em uma menor resposta imune resultante da aplicação do LFU. A diminuição significativa do crescimento do tumor com este protocolo de aplicação se deve, provavelmente, a maior penetração tumoral da DOX e predominância de seu efeito antitumoral em detrimento de qualquer efeito de reparo tecidual produzido pelo ultrassom. Após 21 dias de tratamento com o protocolo de

posicionamento da sonda à 10 mm da superfície da pele, o volume tumoral foi aproximadamente 6 vezes menor do que o do controle.

Não foi detectada a presença de DOX no sangue dos camundongos após 21 dias de tratamento, sugerindo a ação tópica deste tratamento.

6. Conclusão

O desenvolvimento e a caracterização físico-química do nanogel NLS-DOX revelou propriedades adequadas a sua aplicação tópica, como a presença de fases líquido-cristalinas que podem auxiliar na sustentação da liberação bem como no aumento da penetração passiva de fármacos. Nos estudos de LFU, foi demonstrado que simples modificações no meio de acoplamento foram efetivas em aumentar e homogeneizar a área de LTRs na superfície da pele. O uso do nanogel como meio de acoplamento resultou em maior porcentagem de LTRs distribuídas de forma mais homogênea por toda a pele em comparação com o uso do meio de acoplamento tradicional contendo SLS. A influência das LTRs na penetração de fármacos hidrofílicos foi dependente do potencial zeta do hidrogel usado como meio de acoplamento e da dissociação do fármaco. Desta forma, pode-se modular a penetração de fármacos em função do potencial zeta do meio de acoplamento. A composição da formulação aplicada após o pré-tratamento com LFU também afeta a penetração cutânea do fármaco. Assim, a incorporação da NLS-DOX no nanogel diminuiu a penetração da DOX através das LTRs, que são canais aquosos, provavelmente devido ao caráter lipofílico deste sistema. O pré-tratamento do câncer de pele induzido em camundongos com LFU/nanogel, seguido da aplicação tópica da DOX não encapsulada reduziu o crescimento do tumor, mostrando-se como uma estratégia promissora para o tratamento tópico do câncer de pele.

7. Referências bibliográficas

Alexandridis, P.; Zhou, D.; Khan, A. Lyotropic liquid crystallinity in amphiphilic block copolymers: temperature effects on phase behavior and structure for poly (ethylene oxide)-b-poly (propylene oxide)-b-poly (ethylene oxide) copolymers of different compositions. **Langmuir**, v. 12, p. 2690-2700, 1996.

Alvarez-Román, R.; Merino, G.; Kalia, Y.; Naik, A.; Guy, R. Skin permeability enhancement by low frequency sonophoresis: lipid extraction and transport pathways. **J. Pharm. Sci.**, v. 92, n. 6, p. 1138-1146, 2003.

Amar-Yuli, I.; Wachtel, E.; Shoshan, E.B.; Danino, D.; Aserin, A.; Garti N. Hexosome and hexagonal phases mediated by hydration and polymeric stabilizer. **Langmuir**, v. 23, n. 7, p. 3637-3645, 2007.

Andrade, F.; Videira, M.; Ferreira, D.; Sarmiento, B. Nanocarriers for Pulmonary Administration of Peptides and Therapeutic Proteins. **Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 123-141, 2011.

Araújo, L.M.; Thomazine, J.A.; Lopez, R.F. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 75, n. 1, p. 48-55, 2010.

Armstrong, B.K.; Kricker, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 63, n. 1-3, p. 8-18, 2001.

Asai, T.; Tsuzuku, T.; Takahashi, S.; Okamoto, A.; Dewa, T.; Nango, M.; Hyodo, K.; Ishiara, H.; Kikuchi, H.; Oku, N. Cell-penetrating peptide-conjugated lipid nanoparticles for siRNA delivery. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.444, n. 4, p. 599-604, 2014.

Athawale, R.B.; Jain, D.S.; Singh, K.K.; Gude, R. P. Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. **Biomed. Pharmacother.**, v. 68, n. 2, p. 231-240, 2014.

Attama, A. A.; Schicke, B. C.; Paepenmuller, T.; Muller-Goymann, C. C. Solid lipid nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: characterization. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.67, n.1, p.48-57, 2007.

Aula de anatomia. Disponível em: <http://www.auladeanatomia.com/tegumentar/tegumentar.htm>. Acesso em: 20 Jan. 2015.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 677p.

Azaguri, A.; Khoury, L.; Enden, G.; Kost, J. Ultrasound mediated transdermal drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev.**,v. 72, p. 127-143, 2014.

Barja, P.; Veloso, D. Photoacoustic Study of the Penetration Kinetics of Nimesulid into Human Skin. International Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, Journal of Physics: Conference Series 214 (2010).

Barnett, S.B.; Ter Haar, G.; Ziskin, M.; Nyborg, W.; Maeda, K.; Bang, J. Current status of research on biophysical effects of ultrasound. **Ultrasound Med.Biol.**, v. 20, n.3, p. 205-218, 1994.

Barrera, M. V.; Herrera, E. Topical chemotherapy of actinic keratosis and nonmelanoma skin cancer: current options and future perspectives. **Actas Dermosifiliogr.**, v.98, n.8, p. 556-562, 2007.

Becker, B.M.; Helfrich, S.; Baker, E.; Lovgren, K.; Minugh, P.A.; Machan, J.T. Ultrasound with topical anesthetic rapidly decreases pain of intravenous cannulation. **Acad Emerg Med.**, v. 12, n. 4, p. 289-295, 2005.

Behne, M.; Uchida, Y.; Seki, T.; Montellano, P.O.; Elias, P.M.; Holleran, W.M. Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. **J. Investig. Dermatol.**,v. 114, n. 1, p. 185-192, 2000.

Benson, H.A.; McElnay, J.C.; Harland, R.; Hadgraft, J. Influence of ultrasound on the percutaneous absorption of nicotinate esters. **Pharm Res.**, v. 8, n. 2, p. 204-209, 1991.

Bergh, M.; Magnusson, K.; Nilsson, J. L.; Karlberg, A. T. Contact allergenic activity of Tween 80 before and after air exposure. **Contact Dermatitis**, v.37, n.1, p.9-18, 1997.

Bommannan, D.; Okuyama, H.; Stauffer, P.; Guy, R. Sonophoresis. I. The use of high-frequency ultrasound to enhance transdermal drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 9, n. 4, p. 559-564, 1992a.

Bommannan, D.; Menon, G.K.; Okuyama, H.; Elias, P.M.; Guy, R.H. Sonophoresis. II. Examination of the mechanism(s) of ultrasound-enhanced transdermal drug delivery. **Pharm Res.**, v. 8, n. 8, p. 1043-1047, 1992b.

Bottaglia, L.; Trotta, M.; Gallarate, M.; Carloti, M.E.; Zara, G.P.; Bargoni, A. Solid lipid nanoparticles formed by solvent- in- water emulsion- diffusion technique: development and influence on insulin stability. **J. Microencapsulation**, v. 24, n. 7, p. 672-684, 2007.

Boucaud, A.; Montharu, J.; Machet, L.; Arbeille, B.; Machet, M.; Patat, F.; Vaillant, L. Clinical, histologic, and electron microscopy study of skin exposed to low- frequency ultrasound. **Anat. Rec. Part A.**, v. 264, n. 1, p. 114-119, 2001.

Boyd, B.J.; Whittaker, D.V.; Khoo, S.; Davey, G. Hexosomes formed from glycerate surfactants—Formulation as a colloidal carrier for irinotecan. **Int. J. Pharm.**, v. 318, n.1-2, p.154–162, 2006

Burns, C. A.; Brown, M. D. Imiquimod for the treatment of skin cancer. **Dermatol. Clin.**, v.23, n. 1, p. 151-164, 2005.

Burra, N.; Jukanti, R.; Janga, K.Y.; Sunkavalli, S.; Velpula, A.; Ampati, S.; Jayavera, K.N. Enhanced intestinal absorption and bioavailability of raloxifene hydrochloride via lyophilized solid lipid nanoparticles. **Adv. Powder Technol.**, v. 4, n.1, p. 393-402, 2013.

Brown, M.B.; Martin, G.P.; Jones, S.A.; Akomeah, F.K. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. **Drug Deliv.**, v. 13, n. 3, p. 175-187, 2006.

Brucks, R.; Nanavaty, M.; Jung, D.; Siegel, F. The effect of ultrasound on the in vitro penetration of ibuprofen through human epidermis. **Pharm. Res.**, v. 6, n. 8, p. 697-701, 1989.

Byl, N.N. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. **Phys Ther.**, v. 75, n. 6, p. 539-553, 1995.

Carvell, K.J.; Bigelow, T.A. Dependence of optimal seed bubble size on pressure amplitude at therapeutic pressure levels. **Ultrasonics**, v. 51, n. 2, p. 115-122, 2011.

Cavalli, R.; Caputo, O.; Gasco, M.R. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. **Int. J. Pharm.**, v. 89, n. 1, p. R9-R12, 1993.

Chen, B.T.; Wei, J.S.; Iliescu, C. Sonophoretic enhanced microneedles array (SEMA) improving the efficiency of transdermal drug delivery. **Sens. Actuat. B: Chem.**, v. 145, n. 1, p. 54-60, 2010.

Chen, C.C.; Tsai, T.H.; Huang, Z.R.; Fang, J.Y. Effects of lipophilic emulsifier on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 74, n. 3, p. 474-482, 2010.

Choi, J.H.; Jang, J.Y.; Joung, Y.K.; Kwon, M.H.; Park, K.D. Intracellular delivery and anti-cancer effect of self-assembled heparin-Pluronic nanogels with RNase. **J Control Release.**, v. 147, n. 2, p. 420-427, 2010.

Clarke, P. Nonmelanoma skin cancers—treatment options. **Aust. Fam. Physician.**, v. 41, n. 7, p. 476-480, 2012.

Contente, T.C.; Kretzer, I.F.; Filippin-Monteiro, F.B.; Maria, D.A.; Maranhao, R.C. Association of daunorubicin to a lipid nanoemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors enhances the antitumour action and decreases the toxicity of the drug in melanoma-bearing mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 66, n. 12, p. 1698- 1709, 2014.

Concentos básicos sobre acústica. Disponível em : <http://www.angelfire.com/space/portoseguro/GAS/conceitos.htm> Acesso em: 20 Jan. 2015.

Cool, S.K.; Geers, B.; Roels, S.; Stremersch, S.; Vanderperren, K.; Saunders, J.H.; De Smedt, S.C.; Demeester, J.; Sanders, N.N. Coupling of drug containing liposomes to microbubbles improves ultrasound triggered drug delivery in mice. **J Control Release.** v. 172, n. 3, p. 885-893, 2013.

Dahlan, A.; Alpar, H.O.; Murdan, S. An investigation into the combination of low frequency ultrasound and liposomes on skin permeability. **Int J Pharm.**, v. 379, n. 1, p. 139-142, 2009.

Dakowicz, A.; Latosiewicz, R. The value of iontophoresis combined with ultrasound in patients with the carpal tunnel syndrome. **Rocz. Akad. Med. Białymst.**, v. 50, n. 1, p. 196-198, 2005.

De Campos Araújo, L. M. P.; Thomazine, J. A.; Lopez, R. F. V. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 75, n. 1, p. 48-55, 2010.

Dillaha, C.J.; Jansen, G.T.; Honeycutt, W.M.; Bradford, A.C. Selective cytotoxic effect of topical 5-fluorouracil. **Arch Dermatol.**, v. 119, n. 9, p. 774-783, 1983.

Donghee, P.; Hyunjin, p.; Jongbum, S.; Seunghun, L. Sonophoresis in transdermal drug delivery. **Ultrasonics**, v. 54, n. 1, p. 56-65, 2014.

D'Orazio, J.; Jarrett, S.; Amaro-Ortiz, A.; Scott, T. UV radiation and the skin. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 6, p. 2222–2248, 2013.

Downing, D.T. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. **J. Lipid Res.**, v. 33, n. 3, p. 301-313, 1992.

Dubas, L.E.; Ingraffea, A. Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plast Surg Clin N Am.**, v. 21, n. 1, p. 43-53, 2013.

Duck, F.A. Hazards, risks and safety of diagnostic ultrasound. **Med Eng Phys.**, v. 30, n. 10, p. 1338-1348, 2008.

Dudelzak, J.; Hussain, M.; Phelps, R.; Gottlieb, G.; Goldberg, D. Evaluation of histologic and electron microscopic changes after novel treatment using combined microdermabrasion and ultrasound induced phonophoresis of human skin. **J. Cosmet. Laser Ther.**, v. 10, n. 4, p. 187-192, 2008.

Dumitriu, S. Polymeric biomaterials. 2 ed. New York:Marcel Dekker, 2001. 1168 p.

Elias, P.M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. **J. Invest. Dermatol.**, v. 80, p. 44s–49s, 1983.

Engenharia audiovisual. Disponível em: <http://www.eav.eng.br/tech/fisica/Som.html>. Acesso em: 20 Jan. 2015.

Ermertcan, A.T.; Hellings, P.W.; Cingi, C.; Nonmelanoma Skin Cancer of the Head and Neck: Nonsurgical Treatment. **Facial Plast Surg Clin.**, v. 20, n. 4, p. 445-454, 2012.

Escobar-Chavez, J.J.; Bonilla-Martínez, D.; Villegas-González, M.A.; Rodríguez-Cruz, I.M.; C.L. Domínguez-Delgado, C.L. The use of sonophoresis in the administration of drugs throughout the skin. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 12, n. 1, p. 88-115, 2009.

Esposito, E.; Eblovi, N.; Rasi, S.; Drechler, M.; Di Gregorio, G.; Menegatti, E.; Cortesi, R. Lipid-based supramolecular systems for topical application: A preformulatory study. **AAPS PharmSci.**, v. 5, n. 4, p. 1-15, 2003.

Essa, E.A.; Bonner, M.C.; Barry, B.W. Electrically assisted skin delivery of liposomal estradiol; phospholipid as damage retardant. **J. Control Rel.**, v. 95, n. 3, p.535-546, 2004.

Elias, P.M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. **J. Invest. Dermatol.**, v. 80, p. 44s-49s, 1983.

Ermertcan, A.T.; Hellings, P.W.; Cingi, C.; Nonmelanoma Skin Cancer of the Head and Neck: Nonsurgical Treatment. **Facial Plast Surg Clin.**, v. 20, n. 4, p. 445-454, 2012.

Escobar-Chavez, J.J.; Bonilla-Martínez, D.; Villegas-González, M.A.; Rodríguez-Cruz, I.M.; C.L. Domínguez-Delgado, C.L. The use of sonophoresis in the administration of drugs throughout the skin. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 12, n. 1, p. 88-115, 2009.

Esposito, E.; Eblovi, N.; Rasi, S.; Drechler, M.; Di Gregorio, G.; Menegatti, E.; Cortesi, R. Lipid-based supramolecular systems for topical application: A preformulatory study. **AAPS PharmSci.**, v. 5, n. 4, p. 1-15, 2003.

Essa, E.A.; Bonner, M.C.; Barry, B.W. Electrically assisted skin delivery of liposomal estradiol; phospholipid as damage retardant. **J. Control Rel.**, v. 95, n. 3, p.535-546, 2004.

Falkson, G.; Schulz, E.J. Skin changes in patients treated with 5-fluorouracil. **Br J Dermatol.**, v. 74, p. 229-236, 1962.

Farinha, A.; Kellogg, S.; Dickinson, K.; Davison, T. Skin impedance reduction for electrophysiology measurements using ultrasonic skin permeation: initial report and comparison to current methods. **Biomed Instrum Technol.**, v. 40 (1), p.72-77, 2006.

Fellinger, K.; Schmidt, J. Klinik and therapies des chronischen gelenkreumatismus. Maudrich Vienna, p. 549, 552, 1954.

Pharmazeutische PZ Zeitung online. Disponível em: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2957>. Acesso em: 20 Jan. 2015.

Gasco, M.R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. U.S. Patent 5 250 236, 5 october, 1993.

Gelfuso, G. M.; Gratieri, T.; Souza, J. G.; Thomazini, J. A.; Lopez, R. F. V. The influence of positive or negative charges in the passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 77, n. 2, p. 249-256, 2011.

Gelfuso, G. M.; Gratieri, T.; Delgado-Charro, M.B. ; Guy, R. H.; Lopez, R.F.V. Iontophoresis-targeted, follicular delivery of minoxidil sulfate for the treatment of alopecia. **J Pharm Sci.**, v. 102, n. 5, p. 1488-1494, 2013.

Geller, A.C.; Annas, G.D. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer. **Semin. Oncol. Nurs.**, v. 19, n. 1, p. 2-11, 2003.

Gonseca, M.; Rogac, M.B.; Gasperline, M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate. **Eur J Pharm Sci.**, v. 50, n. 1, p. 114-122, 2013.

Gratieri, T.; Lopez, R. F. V.; Gelfuso, G. M. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quim Nova.**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

Gratieri, T.; Gelfuso, G. M.; Rocha, E. M.; Sarmiento, V.H.V.; Freitas, O.; Lopez, R. F. V. A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 75, n. 2, p. 186-193, 2010.

Han, T.; Das, D.B. Permeability enhancement for transdermal delivery of large molecule using low-frequency sonophoresis combined with microneedles. **J. Pharm. Sci.**, v. 102, n. 10, p. 3614-3622, 2013.

Han, T.; Das, D.B. Potential of combined ultrasound and microneedles for enhanced transdermal drug permeation: A review. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 89, p. 312-328, 2015.

He, W.; Guo, X.; Zhang, M. Transdermal permeation enhancement of N-trimethyl chitosan for testosterone. **Int J Pharm.**, v. 356, n. 1-2, p. 82-87, 2008.

Heraí, H.; Gratieri, T.; Thomazini, J. A.; Bentley, M. V. L. B.; Lopez, R. F. V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **Int J Pharm.**, v. 329, n. 1-2, p. 88-93, 2007.

Hikima, T.; Ohsumi, S.; Shirouzu, K.; Tojo, K. Mechanisms of synergistic skin penetration by sonophoresis and iontophoresis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 5, p. 905-909, 2009.

Holmqvist, P.; Alexandridis, P.; Lindman, B. Modification of the microstructure in Poloxamer block copolymer-water-oil systems by varying the oil type. **Macromolecules**, v. 30, n. 22, p. 6788-6792, 1997.

Huber, L.A.; Pereira, T.A.; Ramos, D.N.; Rezende, L.C.D.; Emery, F.S.; Sobral, L.M.; Leopoldino, A.M.; Lopez, R.F.V. Topical skin cancer therapy using doxorubicin-loaded cationic lipid nanoparticles and iontophoresis. **J Biomed Nanotechnol.**, 2015.

Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 20 Jan. 2015.

Iqbal, M.A.; Md, S.; Sahni, J.K.; Baboota, S.; Dang, S.; Ali, J. Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery. **J. Drug Target.**, v. 20, n. 10, p. 813-830, 2012.

Jain, A.K.; Jain, A.; Garg, N.K.; Agarwal, A.; Jain, A.; Jain, S.A.; Tyagi, R.K.; Jain, R. K.; Agrawal, H.; Agrawal, G.P. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: an effective approach for acne treatment. **Colloids Surf B Biointerfaces.**, n.121, p. 222, 229, 2014.

Johnson, M.; Mitragotri, S.; Patel, S.; Blankschtein, D.; Langer, R. Synergistic effects of chemical enhancers and therapeutic ultrasound on transdermal drug delivery. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, n. 7, p. 670-679, 1996.

Jose, S.; Anju, S.S.; Cinu, T.A.; Aleykutty, N.A.; Thomas, S.; Souto, E.B. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. **Int J Pharm.**, v. 474, n. 1-2, p. 6-13, 2014.

Joshi, M.D.; Muller, R.H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 71, n. 2, p. 161-172, 2009.

Kalia, N.Y.; Naik, A.; Garrison, J.; Guy, R.H. Iontophoretic drug delivery. **Adv. Drug. Deliver. Rev.**, v. 56, n. 5, p. 619-658, 2004.

Karande, P.; Mitragotri S. Transcutaneous immunization: an overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies. **Annu Rev Chem Biomol Eng.**; v. 1, p. 175, 201, 2010.

Karande, P.; Jain, A.; Mitragotri, S. Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers. **J Control Release.**, v. 110, n. 2, p. 307-313, 2006.

Katz, N.P.; Shapiro, D.E.; Herrmann, T.E.; Kost, J.; Custer, L.M. Rapid onset of cutaneous anesthesia with EMLA cream after pretreatment with a new ultrasound-emitting device. **Anesth Analg.**, v. 98, n. 2, p. 371-376, 2004.

Kaya, K.; Delialouglu, S.; Babadag, M.; Duleroglu, D.; Ozel, S.; Culha, C.; Gorgun, S. Combined physiotherapy in patients with arthrogenous pain of temporomandibular joint. **J PMR Sci.**, 13, p. 6-14, 2010.

Kestin, J.; Sokolov, M.; Wakeham, W.A. Viscosity of liquid water in the range -8°C to 150°C . **J Phys Chem.** v. 7 n. 3, p. 941-948, 1978.

Khan, M.H.; Alam, M.; Yoo, S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of nonmelanoma skin cancers. **Dermatol. Surg.**, v. 37, n. 9, p. 1199-1209, 2011.

Kost, J.; Pliquett, U.; Mitragotri, S.; Yamamoto, A.; Langer, R.; Weaver, J. Synergistic effect of electric field and ultrasound on transdermal transport. **Pharm. Res.**, v. 13, n. 4, p. 633-638, 1996.

Kovacevic, A.; Savic, S.; Vuleta, G.; Muller, R.H.; Keck, C.M. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. **Int. J. Pharm.**, v. 406, n. 1-2, p.163-172, 2011.

Kunjachan, S.; Rychlik, B.; Storm, G.; Kiessling, F.; Lammers, T. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 65, n. 13-14, p. 1852-1865, 2013.

Kulkarni, C.V.; Watchter, W.; Iglesias-Salto, G.; Engelskirchen, S.; Ahualli, S. Monoolein, a magic lipid? **Phys. Chem.**, v. 13, n. 8, p. 3004-3021, 2011.

Kushner, J.; Blankschtein, D.; Langer, R. Experimental demonstration of the existence of highly permeable localized transport regions in low-frequency sonophoresis. **J. Pharm. Sci.**, v. 93, n. 11, p. 2733-2745, 2004.

Kushner, J.; Blankschtein, D.; Langer, R. Evaluation of the porosity, the tortuosity, and the hindrance factor for the transdermal delivery of hydrophilic permeants in the context of the aqueous pore pathway hypothesis using dual-radiolabeled permeability experiments, **J. Pharm. Sci.**, v. 96, n.12, p. 3263, 2007.

Kushner, J.; Kim, D.; So, P.T.; Blankschtein, D.; Langer, R. Dual-channel two-photon microscopy study of transdermal transport in skin treated with low-frequency ultrasound and a chemical enhancer. **J. Invest. Dermatol.**, v. 127, n. 12, p. 2832-2846, 2007.

Kushner, J.; Blankschtein, D.; Langer, R. Heterogeneity in skin treated with low-frequency ultrasound. **J. Pharm. Sci.**, v. 97, n. 10, p. 4119-4128, 2008a.

Kushner, J.; Blankschtein, D.; Langer, R. Evaluation of hydrophilic permeant transport parameters in the localized and non-localized transport regions of skin treated simultaneously with low-frequency ultrasound and sodium lauryl sulfate. **J. Pharm. Sci.**, v. 97, n. 2, p. 906-918, 2008b.

Kuvshinov, G. I. Effect of surface tension on the collapse of a cavitation bubble *Journal of engineering physics*. **Journal of engineering physics**.,v. 60, n. 1, p. 34-37, 1991.

Lara, M.G.; Bentley, M.V.L.B.; Collett, J.H. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. **Int J Pharm**, v. 293, n. 1-2, p.241-250, 2005.

Lazareth, V. Management of non-melanoma skin cancer. **Semin Oncol Nurs.**, v. 29, n. 3, p. 182-194, 2013.

Lazo, N.D.; Meine, J.G.; Downing, D.T. Lipids are covalently attached to rigid corneocyte protein envelopes existing predominantly as beta-sheets – a solid-state nuclear-magnetic-resonance study. **J. Investig. Dermatol.**, v. 105, n. 2, p. 296-300, 1995.

Le, L.; Kost, J.; Mitragotri, S. Combined effect of low-frequency ultrasound and iontophoresis: applications for transdermal heparin delivery. **Pharm. Res.**, v. 17, n. 9, p. 1151-1154, 2000.

Lee, C.H.; Moturi, V.; Lee, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **J. Control. Release.**, v. 136, n.2, p. 88-98, 2009.

Lee, S.; Choi, K.; Menon, G.; Kim, H.; Choi, E.; Ahn, S.; Lee, S. Penetration pathways induced by low-frequency sonophoresis with physical and chemical enhancers: iron oxide nanoparticles versus lanthanum nitrates. **J. Invest. Dermatol.**, v. 130, n. 4, p. 1063-1072, 2010.

Lee, J.; Kentish, S.; Matula, T.; Ashokkumar, M. Effect of surfactants on inertial cavitation activity in a pulsed acoustic field. **J. Phys. Chem. B.**, v.109, n. 35, p. 16860-16865, 2005.

Leighton, T. An introduction to acoustic cavitation. **Med Sci Ser.**, p. 199-223, 1998.

Lenart, I.; Ausländer, D. The effect of ultrasound on diffusion through membranes, **Ultrasonics**, v. 18, n. 5, p. 216-218, 1980.

Levy, D.; Kost, J.; Meshulam, Y.; Langer, R. Effect of ultrasound on transdermal drug delivery to rats and guinea pigs. **J. Clin. Invest.**, v. 83, n. 6, p. 2074-2078, 1989.

Libster, D.; Aserin, A.; Yariv, D.; Shoham, G.; Garti, N. Soft matter dispersions with ordered inner structures, stabilized by ethoxylated phytosterols. **Colloids Surf B Biointerfaces.**, v.74, n. 1, p. 202–215, 2009.

Liu, D.; Liu, Z.; Wang, L.; Zhang, C.; Zhang, N. Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel. **Colloids Surf. B .Biointerfaces.**, v. 85, n. 2, p. 262-269, 2011.

Liu, H.; Li, S.; Pan, W.; Wang, Y.; Han, F.; Yao, H. Investigation into the potential of low-frequency ultrasound facilitated topical delivery of Cyclosporin A. **Int. J. Pharm.**, v. 326, n. 1–2, p. 32-38, 2006.

Longley, D.B.; Harkin, D.P.; Johnston, P.G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer.**,v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003.

Lopes, L.B.; Lopes, J.L.C.; Oliveira, D.C.R.; Thomazine, J.; Fantini, M.C.; Collett, J.H.; Bentley, M.V.L.B. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of in vitro and in vivo delivery. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 63, n. 2, p. 146-155, 2006.

Lopes, L.B.; Spereta, F. F. F.; Bentley, M. V. L. B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 32, n. 3, p. 209-215, 2007.

Lopez, R.F.V.; Seto, J.E.; Blankschtein, D.; Langer, R. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. **Biomaterials** (Guildford), v. 32, n. 3, p. 933-941, 2011.

Ma, X.; Dong, C. L.; Swadley, A.; Gupte, M.; Leggas, H. C.; Ledebur, R. J.; Mumper. Development of idarubicin and doxorubicin solid lipid nanoparticles to overcome Pgp-mediated multiple drug resistance in leukemia. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 5, p. 151-161, 2009.

Machluf, M.; J. Kost, J. Ultrasonically enhanced transdermal drug delivery. Experimental approaches to elucidate the mechanism. **J. Biomater. Sci., Polym. Ed.**, v. 5, n. 1-2, p. 147-156, 1993.

Madan, V.; Lear, J.T.; Szeimies, R.M. Non-melanoma skin cancer. **Lancet**, v. 375, v. 9715, p. 673-685, 2010.

Maia Filho, A.L.M.; Villaverde, A.B.; Munin, E.; Aimbire, F.; Albertini, R. Comparative study of the topical application of aloe vera gel, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair in collagenase-induced rat tendinitis. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 36, n. 10, p. 1682-1690, 2010.

Mandawgade, S. D.; Patravale, V. B. Development of SLNs from natural lipids: application to topical delivery of tretinoin. **Int. J. Pharm.**, v. 363, n.1-2, p.132-138, 2008.

Marks, F.; Furstenberger, G.; Muller-Decker, K. Metabolic targets of cancer chemoprevention: interruption of tumor development by inhibitors of arachidonic acid metabolism. **Recent Results Cancer Res.**, v. 151, p. 45-67, 1999.

Marquele-Oliveira, F.; Santana, D.C.; Taveira, S.F.; Vermeulen, D.M.; deOliveira, A.R.; da Silva, R.S.; Lopez, R.F.V. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 53, n. 4, p. 843-851, 2010.

Masferrer, J.L.; Leahy, K.M.; Koki, A.T.; Zweifel, B.S.; Settle, S.L.; Woerner, B.M.; Edwards, D.A.; Flickinger, A.G.; Moore, R.J.; Seibert, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Res.**, v. 60, n. 5, p. 1306-1311, 2000./

McElnay, J.C.; Benson, H.A.; Harland, R.; Hadgraft, J. Phonophoresis of methyl nicotinate: A preliminary study to elucidate the mechanism of action. **Pharm Res.**, v. 10, p.1726–1731, 1993.

McGrath, J. A.; Uitto, J. Anatomy and Organization of Human Skin. In: Rook's Textbook of Dermatology Volume 1.

Meguro, S.; Arai, Y.; Masukawa, Y.; Uie, K.; Tokimitsu, I. Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL). **Arch. Dermatol. Res.**, v. 292, n. 9, p. 463-468, 2000.

Mehnert, W.; Mader, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.47, n.2-3, p.165-196, 2001.

Mehnert, W.; Mäder, K. Solid lipid nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 83-101, 2012.

Meidan, V.; Walmsley, A.; Irwin, W. Phonophoresis is it a reality? **Int. J. Pharm.**, v.118, n. 2, p. 129-149, 1995.

Merclin, N.; Bramer, T.; Edsman, K. Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as vehicle. **J Control Release.**, v. 98, n. 1, p. 57-65, 2004.

Meshali, M.; Abdel-Aleem, H.; Sakr, F.; Nazzal, S.; El-Malah, Y. Effect of gel composition and phonophoresis on the transdermal delivery of ibuprofen: in vitro and in vivo evaluation, **Pharm. Dev. Technol.**, v. 16, n. 2, p. 93-101, 2010.

Mitragotri, S.; Blankschtein, D.; Langer, R. Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. **Science.**, v. 269, n. 5225, p. 850-853, 1995.

Mitragotri, S.; Edwards, D.A.; Blankschtein, D.; Langer R. A mechanistic study of ultrasonically-enhanced transdermal drug delivery. **J Pharm Sci.**, v. 84, n. 2, p. 697-706, 1995.

Mitragotri, S.; Blankschtein, D.; Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. **Pharm Res.**, v. 13, n. 3, p. 411, 420, 1996.

Mitragotri, S. Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. **Pharm. Res.**, v. 17, n. 11, p. 1354-1359, 2000.

Mitragotri, S.; Farrell, J.; Tang, H.; Terahara, T.; Kost, J.; Langer, R. Determination of threshold energy dose for ultrasound-induced transdermal drug transport. **J Control Release.**, v. 63, n. 1-2, p. 41-52, 2000a.

Mitragotri, S.; Ray, D.; Farrell, J.; Tang, H.; Yu, B.; Kost, J.; Blankschtein, D.; Langer, R. Synergistic effect of low-frequency ultrasound and sodium lauryl sulfate on transdermal transport. **J. Pharm. Sci.**, v. 89, n. 7, p. 892-900, 2000b.

Mitragotri, S.; Kost, J. Transdermal Delivery of Heparin and Low-Molecular Weight Heparin Using Low-Frequency Ultrasound. **Pharm Res.**, v. 18, n. 8, p. 1151-1156, 2001.

Mizrahy, S.; Goldsmith, M.; Leviatan-Ben-Arye, S.; Kisin-Finfer, E.; Redy, O.; Srinivasan, S.; Shabat, D.; Godim, B.; Peer, D. Tumor targeting profiling of hyaluronan-coated lipid based-nanoparticles. **Nanoscale**, v. 6, n. 7, p. 3742-3752, 2014.

Molavi, O.; Ma, Z.;Mahmud, A.; Alshamsan, A.; Samuel, J.; Lai, R.; Kwon, G.S.; Lavasanifar, A. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of STAT3 inhibitor cucurbitacins in solid tumors. **Int. J. Pharm.**, v. 347, n. 1, p. 118-127, 2008.

Moser, K.; Kriwet, K.; Froehlich, C.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H. Permeation enhancement of a highly lipophilic drug using supersaturated systems. **J. Pharm. Sci.**, v.90, n.5, p.607-616, 2001.

Moser, K.; Kriwet, K.; Froehlich, C.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H. Permeation enhancement of a highly lipophilic drug using supersaturated systems. **J. Pharm. Sci.**, v. 90, n. 5, p. 607-616, 2001.

Muchow, M.; Maincent, P.; Muller, R. H. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.34, n.12, p.1394-1405, 2008.

Muller, R. H.; Mader, K.; Gohla, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.50, n.1, p.161-177, 2000.

Muller, R. H.; Radtke, M.; Wissing, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.54 Suppl 1, p.S131-S155, 2002.

Muller, R. H.; Runge, S. A.; Ravelli, V.; Thunemann, A. F.; Mehnert, W.; Souto, E. B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, n. 3, p. 535-544, 2007.

Nair, A.; Jacob, S.; Al-Dhubiab, B.; Attimarad, M.; Harsha, S. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. **Braz. J. Pharm. Sci.**, vol. 49, n. 3, p. 423-434, 2013.

Nakano, M.; Teshigawara, T.; Sugita, A.; Leesajakul, W.; Taniguchi, A.; Kamo, T.; Matsuoka, H.; Handa, T. Dispersions of liquid crystalline phases of the monoolein/oleic acid/pluronic F127 system. **Langmuir**, v. 18, n. 24, p. 9283-9288, 2002.

Narayanan, D.L.; Saladi, R.N.; Fox, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **Int. J. Dermatol.**, v. 49, n. 9, p. 978-986, 2010.

Neel, V. A.; Sober, A. J. Other Skin Cancers. In: Cancer Medicine Volume 7. Donald W. Kufe, Raphael E. Pollock, Ralph R. Weichselbaum, Robert C. Bast, Ted S. Gansler, James F. Holland and Emil Frei, 1663-1674, DC Decker, ISBN 1-55009-307-X, Colombia.

Newman, M.K .; Kill, M.; Frampton. G. Effects of ultrasound alone and combined with hydrocortisone injections by needle or hypo-spray. **Am J Phys Med.**, v. 37, n.4, p. 206-209, 1958.

Nightingale, K.R.; Kornguth, P.J.; Trahey, G.E. The use of acoustic streaming in breast lesion diagnosis: a clinical study. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 25, n. 1, p. 75-87, 1999.

Ogura, M.;Paliwal, S.; Mitragotri, S. Low-frequency sonophoresis: current status and future prospects. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 60, n. 10, p. 1218-1223, 2008.

Okoro, U.; John, N.D.; Ogbonna A.A.A. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery, in: Application of Nanotechnology in Drug Delivery, 2014.

Paliwal, S.; Menon, G.K.; Mitragotri, S. Low-frequency sonophoresis: ultrastructural basis for stratum corneum permeability assessed using quantum dots. **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, n. 5, p. 1095-1101, 2006.

Pardeike, J.; Hommoss, A.; Muller, R.H. Lipid nanoparticles (SLN,NLC) in cosmetic And pharmaceutical dermal products. **Int.J.Pharm.**, v. 366, n. 1-2, p. 170-184, 2009.

Perrotta, E.R.; Giordano, M.; Malaguarnera, M. Non-melanoma skin cancers in elderly patients. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 8n. 3, p. 474-480, 2011.

Peters, D.C.; Foster, R.H. Diclofenac/hyaluronic acid. **Drugs Aging**, v. 14, n. 4, p. 313-319, 1999.

Polat, B.E.; Blankschtein, D.; Langer R. Low-frequency sonophoresis: application to the transdermal delivery of macromolecules and hydrophilic drugs. **Expert Opin Drug Deliv.**, v. 7, n. 12, p. 1415-1432, 2010.

Polat, B.E.; Hart, D.; Langer, R.; Blankschtein , D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope, and emerging trends. **J Control Release.**, v. 152, .n 3, p.330-348, 2011a.

Polat, B.E.; Figueroa, P.L.; Blankschtein, D.; Langer, R. Transport pathways and enhancement mechanisms within localized and non-localized transport regions in skin treated with low-frequency sonophoresis and sodium lauryl sulfate. **J Pharm Sci.**, v. 100, n. 2, p. 1-18, 2011b.

Polat, B.E.; Deen, W.M.; Langer, R.; Blankschtein, D. A physical mechanism to explain the delivery of chemical penetration enhancers into skin during transdermal sonophoresis - Insight into the observed synergism. **J Control Release.**, v. 158, n. 2, p. 250-260, 2012.

Rassing, J.; Attwood, D. Ultrasound velocity and light scattering studies on the polyoxyethylene–polyoxypropylene copolymer Pluronic F127 in aqueous solution. **Int J Pharm.**, v.13, p. 47-55, 1983.

Ribeiro, C.J. Cosmetologia Aplicada a Dermoestética. 2ª edição; São Paulo; Pharmabooks; 2010.

Riesz, P.; Kondo, T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological Implications. **Free Radical Biol. Med.**, v 13, n. 3, p. 247-270, 1992.

Rowe, D.E.; Carroll, R.J.; Day Jr, C.L. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. **J Am Acad Dermatol.**, v. 26, n. 6, p. 976-990, 1992.

Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. **N Engl J Med.**, v. 353, p. 2262-2269, 2005.

Ruckmani, K.; Sivakumar, M.; Ganeshkumar, P.A. Methotrexate loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for effective treatment of carcinoma. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 6, p. 1-5, 2006.

Schlupp, P.; Blaschke, T.; Kramer, K.D.; Hölte H.D.; Mehnert, W.; Schäfer-Korting, M. Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles and a base cream: a systematic approach from a comparison of three glucocorticoids. **Skin Pharmacol Physiol.**, v.24, p. 199-209, 2011.

Schmid, M.H.; Korting, H. C. Therapeutic progress with topical liposome drugs for skin disease. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.18, n.3, p. 335-342, 1996.

Schoellhammer, C.M.; Polat, B.E.; Mendenhall, J.; Maa, R.; Jones, B., Hart, D.P.; Langer, R.; Blankschtein, D. Rapid skin permeabilization by the simultaneous application of dual-frequency, high-intensity ultrasound. **J Control Release.**, v. 163 (2), p.154-60, 2012.

Schoellhammer, C.M.; Srinivasan, S.; Barman, R.; Mo, S.H.; Polat, B.E.; Langer, R.; Blankschtein, D. Applicability and safety of dual-frequency ultrasonic treatment for the transdermal delivery of drugs. **J Control Release.**, v. 202, p. 93-100, 2015.

Seetapan, N.; Bejrapha, P.; Srinuanchai, W.; Ruktanonchai, U.R. Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs). **Micron.**, v. 41, n. 1, p. 51-58, 2010.

Seto, J.; Polat, B.; Lopez, R.; Blankschtein, D.; Langer, R. Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. **J. Control. Release.**, v. 145, n. 1, p. 26-32, 2010.

Shah, J. C.; Sadhale, y.; Chilukuri, M.D. Cubic phase gel as drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 47, n. 2-3, p. 229-250, 2001.

Shah, P.; Desai, P.; Patel, A.; Singh, M. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1607-1617, 2012.

Silva, A. C.; Kumar, A.; Wild, W.; Ferreira, D.; Forbes, B. Long-term stability and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles. **Int J Pharm**, v. 436, n. 1-2, p. 798-805, 2012.

Silveira, F.; Barja, P.; Acosta-Avalos, D. Photoacoustic Evaluation of the Penetration of Piroxicam Gel Applied with Phonophoresis into Human Skin, International Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, p. 8, 2010.

Simões, M.C.; Sousa, J.J.; Pais, A.A. Skin cancer and new treatment perspectives: a review. **Cancer Lett.**, v. 357, n. 1, p. 8-42, 2015.

Simonetti, L.D.D.; Gelfuso, G.M.; Barbosa, J. C. R.; Lopez, R. F. V. Assessment of the percutaneous penetration of cisplatin: The effect of monoolein and the drug skin penetration pathway. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 73, n. 1, p. 90-94, 2009.

Simonin, J. On the mechanisms of in vitro and in vivo phonophoresis. **J. Control. Release.**, v. 33, n. 1, p. 125-141, 1995.

Singh S. Phase transitions in liquid crystals. **Phys Rep** v. 324, n. 2-4, p. 107-269, 2000.

Silva, A.C.; Kumar, A.; Wild, W.; Ferreira, D.; Santos, D.; Forbes, B. Long-term stability, biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles. **Int J Pharm.**, v. 436, v.1-2, p. 798-805, 2012.

Smith, N.B.; Lee, S.; Maione, E.; Roy, R.B.; McElligott, S.; Shung, K.K. Ultrasound-mediated transdermal transport of insulin in vitro through human skin using novel transducer designs. **Ultrasound Med Biol.**, v. 29, n. 2, p. 311-317, 2003

Souto, E.B., Wissing, S.A., Barbosa, C.M., Muller, R.H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 58, p. 83-90, 2004

Souto, E.B.; Muller, R.H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN, NLC). **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.30, n.3, p.157-165, 2008.

Souza, L.G. ; Martins, A.L.L. ;**Taveira, S.F.**; Valadares, M.C. ;Lima, E.M.; Braga, R.C.; Silva, E.J. ; Mota, M.F. ; Marreto, R.N. . Development of topotecan loaded lipid nanoparticles for chemical stabilization and prolonged release. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 79, n. 1, p. 189-196, 2011a.

Souza, J.G.; Gelfuso, G.M.; Simão, P.S.; Borges, A.C.; Lopez, R.F.V. Iontophoretic transport of zinc phthalocyanine tetrasulfonic acid as a tool to improve drug topical delivery. **Anticancer Drugs**, v. 22, n. 8, p. 783-793, 2011b.

Spierings, E.L.; Brevard, J.A.; Katz, N.P. Two-minute skin anesthesia through ultrasound pretreatment and iontophoretic delivery of a topical anesthetic: a feasibility study. **Pain Med.**, v. 9, n. 1, p. 55-59, 2008.

Subedi, R.K.; Kang, K.W.; Choi, H.K. Peparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with Doxorubicin. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 37, n. 3-4, p. 508-513, 2009.

Svensson, B.; Alexandridis, P.; Olsson, U. Self-Assembly of a Poly(ethylene oxide)/Poly(propylene oxide) Block Copolymer (Pluronic P104, (EO)₂₇(PO)₆₁(EO)₂₇) in the Presence of Water and Xylene. **J. Phys. Chem. B**, v. 102, n. 39, p. 7541-7548, 1998.

Swartzendruber, D.C.; Wertz, P.W.; Madison, K.C.; Downing, D.T. Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. **J. Invest. Dermatol.**, v. 88, n. 6, p. 709-713, 1987.

Tachibana, K.; Tachibana, S. Transdermal delivery of insulin by ultrasonic Vibration. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 43, n. 4, p. 270-271, 1991.

Tachibana, K. Transdermal delivery of insulin to alloxan-diabetic rabbits by ultrasound exposure. **Pharm. Res.**, v. 9, n. 7, p. 952-954, 1992.

Tachibana, K.; Tachibana, S. Use of ultrasound to enhance the local anesthetic effect of topically applied aqueous lidocaine. **Anesthesiology**, v. 78, n. 6, p. 1091-1096, 1993.

Talelli, M.; Iman, M.; Varkouhi, A.K.; Rijcken, C.J.; Schiffelers, R.M.; Etrych, T.; Ulbrich, K.; Van Nostrum, C.F.; Lammers, T.; Storm, G.; Hennink, W.E. Core-crosslinked polymeric micelles with controlled release of covalently entrapped doxorubicin. **Biomaterials.**, v. 31, n. 30, p. 7797-7804, 2010.

Tan, S.; Sasada, T.; Bershteyn, A.; Yang, K.; Ioji, T.; Zhang, Z. Combinational delivery of lipid-enveloped polymeric nanoparticles carrying different peptides for anti-tumor immunotherapy. **Nanomedicine**, v. 9, n. 5, p. 635-647, 2014.

Tang, H.; Wang, C.; Blankschtein, D.; Langer, R. An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasound-mediated transdermal drug transport. **Pharm. Res.**, v. 19, n. 8, p. 1160-1169, 2002.

Tang, H.; Blankschtein, D.; R. Langer, R. Effects of low-frequency ultrasound on the transdermal permeation of mannitol: comparative studies with in vivo and in vitro skin. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, n. 8, p. 1776-1794, 2002.

Tannock I. F.; Lee C. M.; Tunggal J. K.; Cowan D. S.; Egorin M. J. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. **Clin. Cancer Res.**v.8, p. 878–884, 2002.

Taveira, S.F.; Lopez, R. F. V.; Nomizo, A. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **J Control Release.**, v. 134, n. 1, p. 35-40, 2009.

Taveira, S. F., Lopez, R. F. V. Topical Administration of Anticancer Drugs for Skin Cancer Treatment. In: Caterina AM La Porta. (Org.). Skin Cancers - Risk Factors, Prevention and Therapy. 1ed.: InTech, 2011, v. 1, p. 247-272.

Taveira, S.F.; de Campos Araújo, L.M.P.; de Santana, D.C.A.S.; Nomizo, A.; de Freitas, L.A.; Lopez, R.F.V. Development of Cationic Solid Lipid Nanoparticles with Factorial Design-Based Studies for Topical Administration of Doxorubicin. **J. Biomed. Nanotech.**, v. 8, n. 2, p. 219-228, 2012.

Taveira, S.F.; De Santana, D.C.; Araújo, L.M.; Marquele-Oliveira, F.; Nomizo, A.; Lopez, R.F.V. Effect of iontophoresis on topical delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 10, n. 7, p. 1382-1390, 2014.

Teskac, K.; Kristl, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **Int. J. Pharm.**, v. 390, n. 1, p. 61-69, 2010.

Terahara, T.; Mitragotri, S. Langer, R. Porous resins as a cavitation enhancer for low-frequency sonophoresis. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, n. 3, p. 753-759, 2002.

Tezel, A.; Sens, A.; Tuchscherer, J.; Mitragotri, S. Frequency dependence of sonophoresis. **Pharm Res.**, v. 18, n. 12, p. 1694- 1700, 2001.

Tezel, A.; Sens, A.; Mitragotri, S. Investigations of the role of cavitation in low-frequency sonophoresis using acoustic spectroscopy. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, n. 2, p. 444-453, 2002.

Tezel, A.; Sens, A.; Tuchscherer, J.; Mitragotri, S. Synergistic effect of low-frequency ultrasound and surfactants on skin permeability. **J. Pharm. Sci.**, n. 91. N. 1, p. 91-100, 2002.

Tezel, A.; Sens, A.; Mitragotri, S. Description of transdermal transport of hydrophilic solutes during low-frequency sonophoresis based on a modified porous pathway model. **J Pharm Sci.**, v. 92, n. 2, p. 381-393, 2003.

Tezel, A.; Dokka, S.; Kelly, S.; Hardee, G.E.; Mitragotri, S. Topical delivery of anti-sense oligonucleotides using low-frequency sonophoresis. **Pharm Res.**, n. 21, n. 12, p. 2219-2225, 2004.

Tezel, A.; Paliwal, S.; Shen, Z.; Mitragotri, S. Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. **Vaccine.**, v.23, n. 29, p. 3800-7, 2005.

Trotta, M.; Gasco, M.R.; Carlotti, M.E. Simulated absorption of doxorubicin as ion pair., **Pharm. Acta. Helv.**, v. 63, p. 23-25, 1988.

Tutrone, W.D.; Saini, R.; Caglar, S.; Weinberg, J.M.; Crespo, J. Topical therapy for actinic keratoses, II: diclofenac, colchicine, and retinoids. **Cutis**, v.71, n. 5, p. 373-379, 2003.

Tyle, P.; Agrawala P. Drug delivery by phonophoresis. **Pharm Res.**, v. 6, n. 5, p. 355-361, 1989.

Ueda, K.; Sugibayashi, Y. Morimoto, Skin penetration-enhancing effect of drugs by phonophoresis. **J. Control. Release.**, v. 37, n. 3, p. 291-297, 1995.

Uner, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

Vokes, E.E.; Golomb, H.M. Editors, *Oncologic Therapies*, Vol. 1, Springer Science & Business Media, New York (2003).

Zhang, X.; Sun, X.; Li, J.; Zhang, X.; Gong, T.; Zhang, Z.; Lipid nanoemulsions loaded with doxorubicin-oleic acid ionic complex: characterization, in vitro and in vivo studies. **Pharmazie**, v. 66, p. 496-505.

Yang, S.; Zhu, J.; Lu, Y.; Liang, B.; Yang, C. Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration. **Pharm Res.**, v. 16, n. 5, p. 751-757, 1999.

Yassin, A.E.; Anwer, M.K.; Mowafy, H.A.; El-Bagory, I.M.; Bayomi, M.A.; Alsarra, I.A. Optimization of 5-fluorouracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer. **Int. J. Med. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 398-408, 2010.

Wartofsky, L.; Nostrand, D.V. Editors, *Thyroid cancer a comprehensive guide to clinical management*, Vol. 1, Humana Press, Totowa, 2006.

Watanabe, S.; Takagi, S.; Ga, K.; Yamamoto, K.; Aoyagi, T. Enhanced transdermal drug penetration by the simultaneous application of iontophoresis and sonophoresis. **Drug Del Sci Tech.**, v. 19, n. 3, p. 185-189, 2009.

Wei, G.; Xu, H.; Ding, P.T.; Li, M.S.; Zheng, J.M. Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies. **J. Control. Release**, v. 83, n. 1, p. 65-74, 2002.

Weimann, L.J.; Wu, J. Transdermal delivery of poly-L-lysine by sonomacroporation. **Ultrasound Med. Biol.**, v. 28, n. 9, p. 1173-1180, 2002.

Williams, A. A possible alteration in the permeability of ascites cell membranes after exposure to acoustic microstreaming. **J. Cell Sci.**, v. 12, p. 875, 885, 1973.

Wissing, S. A.; Muller, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **Int. J. Pharm.**, v.254, n.1, p.65-68, 2003.

Wissing, S.A.; Kayser, O.; Muller, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Adv. Drug Delivery Rev.** v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.

Wolloch, L.; Kost, J. The importance of microjet vs shock wave formation in sonophoresis. **J Control Release.**, v. 148, n. 2, p. 204-211, 2010.

Wong, H. L.; Bendayan, R.; Rauth, A. M.; Wu, X. Y. Development of solid lipid nanoparticles containing ionically complexed chemotherapeutic drugs and chemosensitizers. **J. Pharm. Sci.**, v.93, n.8, p.1993-2008, 2004.

Wu, J.; Nyborg, W.L. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 60, n. 10, p. 1103-1116, 2008.

8. Anexos

8.1. Documento de aprovação do comitê de ética para realização dos testes *in vivo*.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.727.53.1), intitulado "Estudo da Influência do Ultrassom de Baixa Frequência (US) Associado ao Lauril Sulfato de Sódio (SLS) na Penetração de Nanopartículas Lipídicas Sólidas na Pele e seu Potencial uso no Tratamento do Câncer de pele", de autoria de **Renata Fonseca Vianna Lopez** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05/07/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.727.53.1), entitled: "Estudo da Influência do Ultrassom de Baixa Frequência (US) Associado ao Lauril Sulfato de Sódio (SLS) na Penetração de Nanopartículas Lipídicas Sólidas na Pele e seu Potencial uso no Tratamento do Câncer de Pele", by **Renata Fonseca Vianna Lopez**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, July 05, 2011.

Ribeirão Preto, 3 de agosto de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964